

Zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

eingereicht von
Horst Rauchfuß
aus Eisleben

1964

1965

Zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

eingereicht von
Horst Rauchfuß
aus Eisleben
1964



Referent: Prof.Dr. G.Pfleiderer

Korreferent: Prof.Dr. Th.Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 18./19.2.1965

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
Oktober 1961 bis Juni 1963 im Biochemischen
Institut der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Pfeleiderer
danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas
und seine wertvollen Anregungen bei der Durchführung die-
ser Arbeit. Außerdem habe ich ihm und Herrn Prof. Dr.
Th. Wieland für die gewährte materielle Hilfe herzlich zu
danken.

In gleicher Weise bin ich Herrn Dr. W. Gruber für seine
vielen wertvollen Ratschläge und eine angeregte Diskussion
des Themas zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.)	Theoretischer Teil	1
I.	Die Bedeutung des Glutamins im Stoffwechsel	1
II.	Die Aktivierung von Aminosäuren	7
	a) Unter Pyrophosphatsä ^b ltung des ATP	8
	b) Unter Phosphatspaltung des ATP	10
III.	Die enzymatische Glutaminbildung Frühere Arbeiten aus dem Frankfurter Institut. Problemstellung der vor- liegenden Arbeit	11
B.) I	Darstellung der Glutaminsynthetase	21
	a) aus Erbsen	22
	b) aus Schafhirn	25
II	ATP*-Synthesen	26
	a) β -, γ - ^{32}P -ATP	26
	b) γ - ^{32}P -ATP	26
	c) ^{32}P -AMP	27
	d) α - ^{32}P -ATP	31
	e) β - ^{32}P -ADP	32
III	MPS - Synthesen	33
IV	Optische Versuche	35
	a) Der optische Test	35
	b) Optische Bestimmung der Zündreaktion	39
	c) Phosphathemmung	43
	d) Optische Bestimmung der Aktivie- rungsreaktion	44
V	Isotopeneinbauversuche	44
	a) Mg^{++} -Abhängigkeit der Glutaminsyn- these	44
	b) ADP*/ATP-Austausch	45
	c) P*/ATP-Austausch	47

	Seite
VI. Versuche an Sephadex-Säulen	48
a) Fehlerquellen bei der Sephadex-Filtration	48
b) MPS-vergiftetes Enzym	50
c) Versuche mit markiertem ATP*	53
d) " " " P*	57
e) " " ¹⁴ C-Glutaminsäure	58
C.) Diskussion	59
D.) Zusammenfassung	64
E.) Experimenteller Teil	67
1-2 Glutaminsynthetase-Darstellung	67-72
3-6 ³² P-ATP-Synthesen	72-76
7 Methoden	77
8 ³⁵ S-MPS - Synthese	80
9 Optischer Test	84
10 Hydroxamsäure-Test, Vergleich der Enzymeinheiten	85
11 Zündreaktion	86
12 Hemmung durch Phosphat	91
13 Aktivierungsreaktion	91
14 Mg ⁺⁺ -Abhängigkeit	92
15, } Austauschreaktionen	93-95
16 }	
17 MPS	96
18 Versuche mit ATP*	98
19 " " P*	101
20 " " ¹⁴ C-Glutamat	103
21 Blindwerte	104
Literaturverzeichnis	105-109

Abkürzungen:

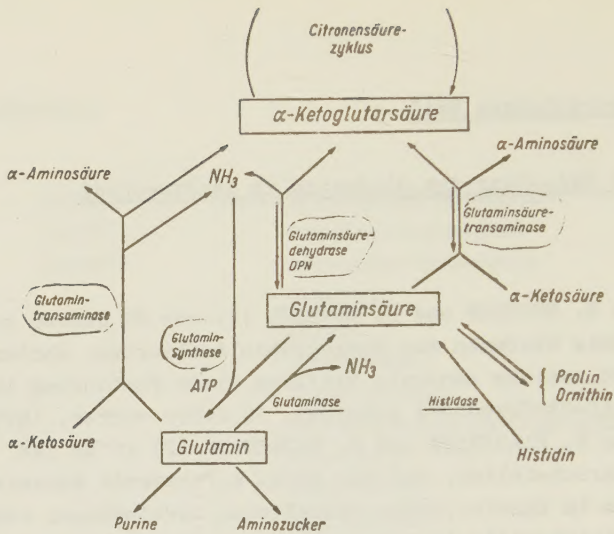
AMP	(AdP)	Adenosinmonophosphat
ADP	(AdPP)	Adenosindiphosphat
ATP	(AdPPP)	Adosintriphosphat
Ad		Adenosin
E		Enzym
AS		Aminosäure
PP		Pyrophosphat
P od. P _{an}		anorganisches Orthophosphat
CoA		Coenzym A
Ac		Acetylrest
GSH		Glutathion
PC ₁		Pyrrolidoncarboxylat
Glu		Glutaminsäure
GluNH ₂		Glutamin
PEP		Phosphoenolbrenztraubensäure
PK		Pyruvatkinase
DPNH		Diphosphopyridinnucleotid, reduziert
DPN		Diphosphopyridinnucleotid, oxydiert
BTS		Brenztraubensäure
LDH		Lactatdehydrogenase
MK		Myokinase
Cys		Cystein
Gly		Glycin
HK		Hexokinase
ZW		Zwischenferment (Glucose-6-phosphat-dehydrogenase)
TPN		Triphosphopyridinnucleotid

A. Theoretischer Teil

I.) Die Bedeutung des Glutamins im Stoffwechsel

Als E. SCHULZE und E. BOSSARD (1) vor 80 Jahren zum ersten Male Glutamin aus Runkelrüben isolierten, ahnten sie nicht, welche zentrale Stellung diese Verbindung im Stickstoff-Stoffwechsel einnimmt. 10 Jahre vorher, 1873, schrieben H. HLASIWITZ und J. HABERMANN (2) : " Es ist höchstwahrscheinlich, daß das stets auftretende Ammoniak von jenen im Casein primär enthaltenen Verbindungen stammt, welche gleichzeitig Asparaginsäure und Glutaminsäure liefern. Es ist der Stickstoff jener NH_2 -Gruppe, die aus Verbindungen wie Asparagin und Glutamin in der Form von Ammoniak austritt, wenn sich Glutamin - und Asparaginsäure bilden."

Nach zahlreichen Untersuchungen an tierischem und pflanzlichem Material erkannte man bald die weite Verbreitung des Glutamins, das sowohl gebunden in Proteinen und Peptiden, als auch als freie Aminosäuren in Tier- und Pflanzenzellen vorkommt. Aber erst allmählich wurde mit dem Aufspüren der verzweigten Stoffwechselwege die physiologische Bedeutung dieser Aminosäure erkennbar: ihre Rolle als Stickstoffspeicher der Zelle:



Stoffwechselreaktionen der Glutaminsäure und des Glutamins.

Abb. 1

Das Glutamin ist, nach obigem Schema, an einer großen Anzahl wichtiger Aufbaureaktionen beteiligt:

Bei der Purinbiosynthese liefert der Glutaminamidstickstoff die N-Atome N_3 und N_9 . In der ersten Stufe reagieren Glutamin (für N_9), Glycin und 5-Phosphoribosylpyrophosphat und bilden Glycinamidribotid. Durch Übertragung eines C_1 -Fragmentes von Formyl-Tetrahydrofolsäure entsteht Formylglycinamidribotid, das die Amidgruppe eines zweiten Glutaminmoleküls (für N_3) aufnimmt. Die Reaktion in der der Imidazolring geschlossen wird, benötigt ATP als Energiedonator:

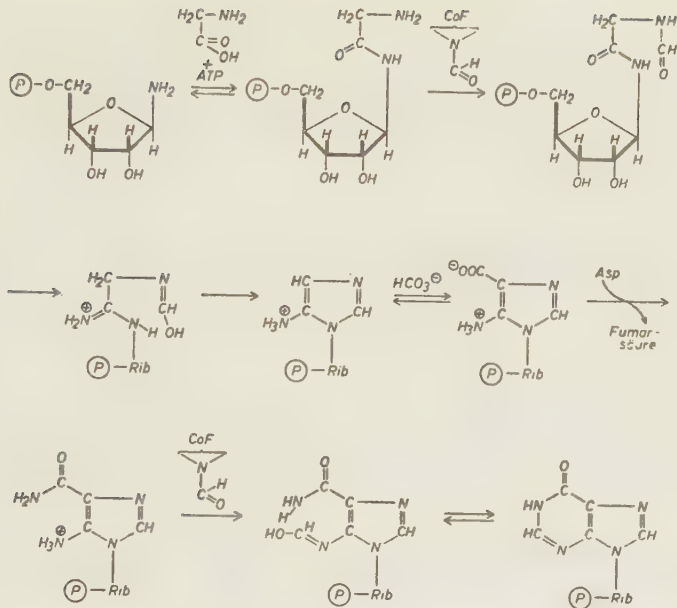


Abb. 2

Die Biosynthese der Aminosucker, z.B. des Glucosamins, sowohl in Bakterien als auch in Säugetierleber, benötigt den Glutaminamidstickstoff für die Synthese von Glucosamin-6-phosphat aus Hexose-6-phosphat und Glutamin.

Auch die Histidinsynthese scheint im tierischen Organismus genau so abzulaufen wie bei Mikroorganismen. Hier stammt das N₃-Atom des Histidins vom Glutamin.

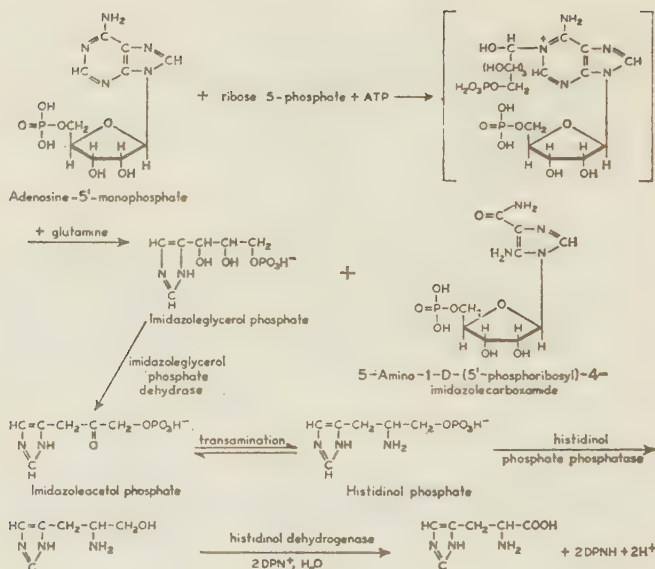
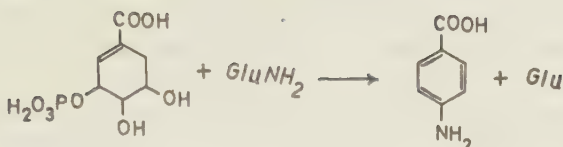


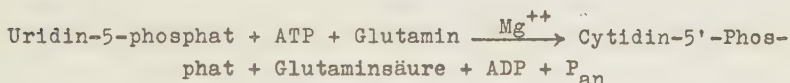
Abb. 3

Die Biosynthese von Anthranilsäure und p-Aminobenzoesäure erfolgt über die gleiche Zwischenverbindung: das Shikimisäure-5-phosphat. Der zellfreie Extrakt einer E. coli-Mutante (try⁻), bei der die Umsetzung von Anthranilsäure zu Indolylglycerinphosphat blockiert ist, katalysiert die Bildung von Anthranilsäure aus Shikimisäure-5-phosphat bei Zusatz von L-Glutamin und Mg⁺⁺. Andere N-Donatoren zeigen eine deutlich verringerte Stimulierung der Reaktion (3). B. WEISS und P.R. SRINIVASAN (4) beobachteten die Überführung von Shikimisäure-5-phosphat durch eine Hefeenzym unter Zusatz von Glutamin in p-Aminobenzoesäure. Auch in diesem Falle waren Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin oder Ammoniumchlorid wesentlich schwächere N-Donatoren als das Glutamin.



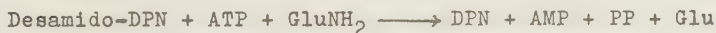
In wachsenden HeLa-Zellen konnte LEVINTOW (5) die Übertragung von Glutaminamidstickstoff auf Asparaginsäure nachweisen. Der genaue Mechanismus dieser Reaktion ist noch ungeklärt.

Untersuchungen über die Pyrimidinbiosynthese lassen ebenfalls eine Beteiligung von Glutamin erkennen. Aus Rattenlebern und Novikoff-Tumoren konnte ein Enzym angereichert werden, das die Reaktion:



katalysiert. Die Umsetzung wird durch niedrige Konzentrationen an GTP und GMP stimuliert.

Glutamin wird auch zur Biosynthese wichtiger Coenzyme wie DPN und TPN benötigt. Nach J. PREISS und HANDLER (6) verläuft die letzte Reaktionsstufe nach:



Das Säureamid der Nicotinsäureverbindung wird also erst zuletzt durch Transamidierung gebildet. Die Endprodukte des Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsels sind Ammoniak, Harnstoff und Harnsäure. Ammoniak findet sich normalerweise im Blut und im Harn als NH_4^+ -Ion in sehr geringer Konzentration. In 100 ml frischem Harn konnten 0,03 mg Ammoniak nachgewiesen werden. Diese Menge erhöht sich auf etwa 2 mg/100 ml, wenn man den Harn einige Zeit stehen läßt. Dabei werden Ammoniakmuttersubstanzen, hauptsächlich Aminosäuren, unter Abspaltung

der Base zersetzt. Harnammoniak wird größtenteils in der Niere gebildet. Wie Untersuchungen von VAN SLYKE (7) zeigen, spielt auch hier das Glutamin eine wichtige Rolle. An Hunden wurde die Niere unter die Haut verpflanzt, um das Blut aus den zu- und abführenden Gefäßen direkt entnehmen und das Strömungsvolumen messen zu können. Die quantitative Analyse zeigte, daß der Glutamingehalt des Blutes beim Durchgang durch die Niere sinkt. Die Abnahme des Amidstickstoffs entsprach genau der NH_3 -Menge, die im Urin ausgeschieden wurde.

Zur Harnstoffbildung in der Leber scheinen außer Asparaginsäure, Glutaminsäure und Glutamin nur noch solche Aminosäuren beizutragen, die durch enzymatische Transaminierung ihre Aminogruppe auf eine der 3 genannten Aminosäuren übertragen können. Aus dem Glutamin wird schließlich Harnstoff gebildet, das Endprodukt des Stickstoff-Stoffwechsels, von L ö f f l e r als "entgifteter Ammoniak" bezeichnet.

Die Bedeutung der Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure für den tierischen Organismus zeigt sich an ihrem hohen Anteil von $\frac{1}{3}$ der Gesamtkonzentration aller Aminosäuren im Blutplasma (35-40 mg an freien Aminosäuren je 100 ml Blutplasma) besonders deutlich.

Die Biochemie des Nervengewebes weist interessante Zusammenhänge mit dem Glutaminstoffwechsel auf. Hirnzellen sind für Glutaminsäure sehr schlecht durchlässig, dagegen vermag Glutamin leicht durch die Zellmembranen zu diffundieren. Die Enzyme Glutaminase (das den Amidstickstoff abspaltet) und Glutaminsynthetase sind im Hirn in relativ hoher Konzentration vorzufinden. Physiologisch dürfte die Entfernung von NH_3 als Glutamin aus den Zellen von entscheidender Bedeutung sein, da Ammoniak auf das Nervensystem eine besonders starke Giftwirkung ausübt.

Diese kurze Aufzählung physiologisch wichtiger Reaktionen, an denen Glutamin beteiligt ist, beweist wohl anschaulich genug die Bedeutung dieser Verbindung. Sie wird ferner betont durch die weite Verbreitung Glutamin bildender Enzyme im Tier- und Pflanzenreich. Zur Abspaltung des Amidstickstoffs aus dem Glutamin scheinen der Zelle 2 Reaktionswege zur Verfügung zu stehen:

1. Die direkte enzymatische Hydrolyse der Amidgruppe
2. Indirekt durch Hydrolyse von α -Ketoglutar säureamid, das durch Transaminierung aus α -Ketoglutar säure und Glutamin gebildet werden kann (8).

Interessanterweise sind alle bekannten N-Amid-Transfer-Reaktionen des Glutamins praktisch irreversibel, sogar die Transaminierung. Das Gleichgewicht der durch Glutaminase katalysierten Hydrolyse von Glutamin liegt ganz auf der Seite der Desaminierung, die Reaktion ist exergonisch. Der umgekehrte Prozeß, die enzymatische Synthese von Glutamin aus Glutaminsäure bedarf der Kopplung mit einer Energie liefernden Reaktion. Die Glutaminsäure muß zur Umsetzung mit dem Ammoniak "aktiviert" werden.

II.) Die Aktivierung von Aminosäuren.

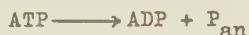
Unter der " Aktivierung " von Aminosäuren versteht man ganz allgemein die Überführung der Aminosäuren in eine energiereiche, reaktionsfähige Form. Der organische Chemiker kann Aminosäuren durch ihre Überführung in verschiedene Säurederivate, wie Säure-ester, -chloride, -anhydride- oder thioester für weitere Umsetzungen "aktivieren".

In der belebten Natur liefert bei den meisten physiologischen Reaktionen das Adenosintriphosphat (ATP), als " Energiespeicher der Zelle ", die für die Aktivierung benötigte Energie. Es kann dabei entweder durch Pyrophosphat-

spaltung:



oder durch Phosphatspaltung:



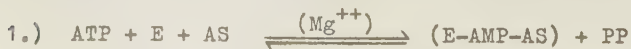
hydrolytisch zerlegt werden. In beiden Fällen beträgt das Gruppenübertragungspotential $\Delta G^0 = -7,7 \text{ kcal/Mol.}$ Mit anderen Worten: die " energiereichen Bindungen " des ATP werden ausgenutzt, um energieverbrauchende, endergonische Reaktionen zu ermöglichen.

Zum Nachweis aktivierter Aminosäuren bedient man sich der bewährten Hydroxamsäure-Methode. Aktivierte Aminosäuren bilden mit dem stark nucleophilen Hydroxylamin Hydroxamsäuren und diese geben mit Fe^{3+} eine rote Komplexverbindung, deren Farbintensität zur quantitativen Bestimmung der Aminoacylverbindung benutzt wird. Eine ähnlich noch empfindlichere Bestimmungsmethode arbeitet mit ^{14}C -Methylhydrazin. Das gebildete Hydrazid wird hierbei durch Messung der Radioaktivität bestimmt.

Bis heute wurde eine große Anzahl wichtiger endergoner, biochemischer Reaktionen bekannt, die unter Kopplung mit der energieliefernden ATP-Spaltung verlaufen. Einige der wichtigsten und physiologisch interessantesten Umsetzungen seien hier kurz erwähnt:

a) Unter Pyrophosphat-Spaltung des ATP verlaufende Reaktionen:

Die Aktivierung der α -Aminosäuren ist der erste Schritt eines der z.Zt. aktuellsten biochemischen Probleme, der Proteinbiosynthese. Am aminosäurespezifischen, aktivierenden Enzym bildet sich ein Enzym-AMP-AS-Anhydrid:

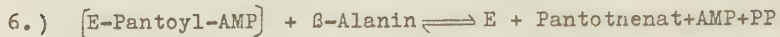
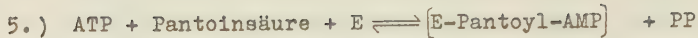


Diese Umsetzung wurde von HOAGLAND (9) aufgefunden, als er den Einbau von radioaktivem Pyrophosphat in ATP bei Anwesenheit von L-Aminosäuren und der Proteinfraction eines Rattenleberhomogenates beobachtete. Außerdem katalysierte diese Proteinfraction auch den Einbau von ^{14}C -L-Aminosäuren in das Mikrosomenprotein. Einen ersten Beweis für das Vorliegen einer Aktivierung der Carboxylgruppe konnte LIPMANN (10) erbringen. An der Carboxylgruppe mit ^{18}O -markierte L-Aminosäuren zeigten den Übergang des ^{18}O -Atoms an das AMP-Molekül. Eine ähnliche Reaktionsfolge liegt auch bei der Fettsäureaktivierung in höheren Organismen vor. Die chemisch relativ reaktionsträgen Fettsäuren werden unter ATP-Spaltung über ihre Adenylsäure^{an}hydride in die ähnlich energiereichen Thioester des CoA überführt nach:



Die durch die katalytische Wirkung der Thiokinassen gebildeten Fettsäure-CoA-Verbindungen durchlaufen dann den bekannten Abbaucyklus der β -Oxydation. Neben der Aktivierung der höheren Fettsäuren folgt auch die Bildung der "aktivierten Essigsäure" aus Acetat diesem Reaktionsmechanismus, der dadurch besondere Bedeutung erlangt. Das energiereiche Zwischenprodukt Adenylacetat ist fest an das aktivierende Enzym gebunden. Es ist nur mittels des Hydroxamsäuretests nachweisbar.

Auch an der Biosynthese des Vitamins Pantothersäure, das aus Pantoinsäure und β -Alanin gebildet wird, ist ATP beteiligt. Die Pantoinsäure muß an der Carboxylgruppe aktiviert werden, um mit β -Alanin reagieren zu können. Ein aus E.coli angereichertes Enzym katalysiert die Umsetzung:



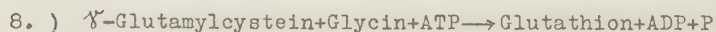
Bei der Synthese von Hippursäure wird Benzoesäure unter ATP-Spaltung mit CoA in die aktivierte Form, Benzoyl-CoA überführt, das dann mit Glycin zu Hippursäure reagiert.

b) Unter Phosphat-Spaltung des ATP verlaufende Reaktionen.

Die Biosynthese von Succinyl-CoA läuft, wie im tierischen Organismus aufgefunden wurde, in 2 Reaktionsschritten ab: Propionyl-CoA nimmt unter Phosphat-Spaltung des ATP CO_2 auf, wobei zunächst Methylmalonyl-CoA gebildet wird. Unter der Einwirkung einer Isomerase (mit B_{12} als Coenzym) lagert sich Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA um.

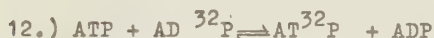
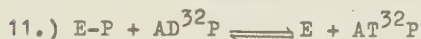
Die erste Peptidsynthese deren Wirkungsmechanismus mit Hilfe gereinigter Enzymsysteme untersucht wurde (11) ist die Synthese des Tripeptids Glutathion, das in der Zelle als Schutzsubstanz für die SH-Gruppen der Proteine eine wichtige Funktion erfüllt.

Die Glutathionsynthese verläuft in 2 Reaktionsschritten, die beide ATP-abhängig sind und von 2 spezifischen Enzymen (Glutathionsynthetase I und II) katalysiert werden. Das erste Enzym konnte aus Weizenkeimen (12), das zweite aus Taubenleber (13) von BLOCH und aus Hefe (14) von SNOKE isoliert werden. Für die Gesamtreaktion gilt:

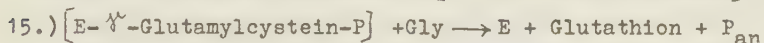
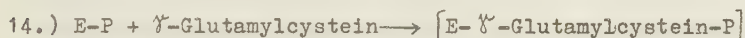


Vielleicht besteht hier der erste Reaktionsschritt in einer Phosphorylierung des Enzyms, da bei Abwesenheit des

Substrats ein Phosphataustausch zwischen ADP und ATP gefunden wurde:



Die Glutathionbildung aus dem Dipeptid (Gl.8) scheint über folgende Zwischenstufen abzulaufen:



An der enzymatischen Synthese von Glutamin aus Glutaminsäure und Ammoniak ist ebenfalls ATP als Energiedonator beteiligt nach:



Die Ausbildung der Amidbindung ähnelt der Knüpfung einer Peptidbindung. Die Glutaminsynthese kann daher als vereinfachtes Modell einer Peptidsynthese gelten. Auf diese Vorstellung gründen sich die großen Anstrengungen zahlreicher Arbeitskreise zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus des Enzyms Glutaminsynthetase.

III.) Die enzymatische Glutaminbildung.

Bereits 1935 beobachtete KREBS (15) an Nierenschnitten von Meerschweinchen eine vermehrte chemische Bindung von Ammoniak bei Zugabe von Glutaminsäure. Aus Gewebeschnitten gelang ihm die Isolierung von Glutamin, das gerade 3 Jahre zuvor von BERGMANN (16) erstmalig mit Hilfe der Carbobenzoxy-Methode chemisch synthetisiert worden war. Da die Glutamin-

synthese in den Gewebeschnitten unter anaeroben Bedingungen nicht ablief und durch Cyanid hemmbar war, folgerte K r e b s, daß die Glutaminsynthese eine endotherme Reaktion sein müsse, die von einer energieliefernden Reaktion abhängt.

1947 berichteten LEUTHARDT und BUJARD (17,18) über Untersuchungen in zellfreien Systemen aus Leberhomogenaten, in denen eine beschleunigte Glutaminsynthese bei Zugabe von ATP und Mg^{2+} -ionen zu beobachten ist.

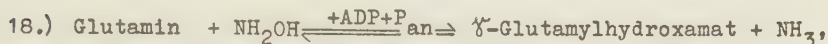
Versuche von SPECK und ELLIOTT (19,20) unterstützten den Befund, daß die Energie für die endogene Glutaminbildung aus der hydrolytischen Spaltung des ATP stamme. S p e c k bewies Glutaminbildung bei Inkubation von frischem Taubenleberhomogenat mit Glutaminsäure, Ammoniak, Phosphat und Mg^{++} -ionen in Gegenwart von O_2 . Fraktionierte Extrakte von Taubenleber-Aceton-trockenpulver, inkubiert mit ATP, Mg^{++} , Glutaminsäure und Ammoniak banden äquimolare Mengen von NH_3 , während sich eine entsprechende Menge von " säurelabilem Ammoniak " und Phosphat bildeten. Wesentlich war die Beobachtung, daß ADP erst nach Zusatz von Adenylatkinase die Glutaminbildung in Gang setzt. ELLIOTT (22) und ELLIOTT und GALE (23) bestätigten die obigen Ergebnisse mit Extrakten aus Schafshirn und Staphylococcus aureus; aus dem Inkubationsansatz konnte ein Produkt isoliert werden, daß zu 71% aus Glutamin bestand.

Aus diesen Befunden wurde die durch Glutaminsynthetase katalysierte Glutaminbildung abgeleitet:



Ersetzt man den Ammoniak durch Hydroxylamin, so bildet sich γ -Glutamylhydroxamsäure, die mit $FeCl_3$ eine rote Färbung ergibt. Derartige Farbkomplexe lassen sich nach LIPMANN und TUTTLE (24) kolorimetrisch zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität benutzen.

Am hochgereinigten Enzym konnte nicht nur die Glutamin- bzw. die γ -Glutamylhydroxamsäure-Synthese beobachtet werden, sondern ebenso auch die Umsetzung:



wenn katalytische Mengen von ADP und P_{an} im Inkubationsansatz vorhanden sind. Da man lange Zeit annahm, die Umsetzung 18 werde durch ein neues Enzym katalysiert, bezeichnete man dieses als γ -Glutamotransferase. Genaue Messungen der relativen Synthetase- und Transferaseaktivität im Laufe der Enzymreinigung aus Erbsen zeigen jedoch, daß das Verhältnis beider Enzymaktivitäten konstant bleibt.

Das gleiche Ergebnis erhielten PAMILJANS et al. (25) bei der Reinigung des Enzyms aus Schafshirn.

Hitzestabilität und Hemmstoffempfindlichkeit sind beim Erbsenenzym für beide Enzymaktivitäten recht ähnlich, wenn auch vielleicht nicht genau gleich (26).

Untersuchungen an gereinigten Enzympräparaten in der analytischen Ultrazentrifuge lassen ebenfalls darauf schließen, daß die Synthetase- und die γ -Glutamotransferaseaktivität einem einzigen Protein zuzuschreiben sind. Dennoch bestehen zwischen beiden Aktivitäten einige Unterschiede, die nicht übersehen werden dürfen:

a) Das Synthetase-System benötigt stöchiometrische Mengen an Nucleotid, während das Transferase-System nur katalytische Nucleotid- und Phosphat-Konzentrationen für seine optimale Wirksamkeit braucht.

Das Verhältnis von Synthese- zu Transferaktivität ändert sich

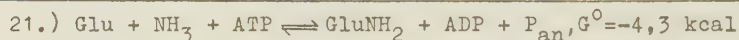
b) bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen (von Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++}) und

c) bei unterschiedlichen pH-Werten.

d) Die Hemmwirkung durch Fluorid und die Aktivierung der Enzymaktivitäten durch Cystein sind für die Synthetase, bzw. Transferase verschieden stark.

Gleichwohl darf heute das Vorliegen eines einzigen Enzyms, das beide Reaktionen bewirkt, als sicher gelten.

Die Bruttoreaktion 17. der Glutaminsynthese läßt sich, energetisch betrachtet, in 2 Teilreaktionen aufgliedern, von denen die erste endergonisch, die zweite exergonisch abläuft:



Das Gleichgewicht liegt danach weit zugunsten der Glutaminbildung ($K = 1,2 \cdot 10^{-3}$, bei pH 7,0 und 37°C). Alle Versuche freie, energiereiche Zwischenprodukte aufzufinden und zu isolieren, verliefen erfolglos.

LEVINTOW und MEISTER (27) gelang es zwar in einem Inkubationsansatz, der synthetisiertes γ -Glutamylphosphat (aus N-Acetyl-Glutamylphosphat + Aminosäure-N-Acylase) und Enzym enthielt, Glutamin nachzuweisen; die gleiche Glutaminsyntheserate erhielten die Autoren aber auch ohne Enzymzusatz.

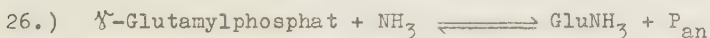
Durch Isotopenmarkierung versuchte man weitere Aufschlüsse über das Reaktionsgeschehen zu erhalten. B o y e r setzte ^{18}O -markierte Glutaminsäure in das Synthesesystem ein und fand, bei Verwendung von H_2^{16}O als Lösungsmittel das Isotop im gebildeten Phosphat. K o w a l s k y führte eine quantitative Isotopenbestimmung durch. Je Mol an gebildetem Glutamin- oder γ -Glutamylhydroxysäure wird ein ^{18}O -Atom von der Glutaminsäure auf das Phosphat übertragen. Diese Ergebnisse liessen auf eine Anhydridbindung zwischen

der γ -Carboxylgruppe des Glutamats und der endständigen Phosphatgruppe des ATP schliessen.

Der Isotopenaustausch zwischen ADP und ATP erreichte erst bei Anwesenheit von Glutaminsäure meßbare Geschwindigkeit (30,31). Zur Erklärung dieses Effektes schlugen WEBSTER und VARNER (32) folgenden Mechanismus vor:



Dabei erkannte man anfangs die Notwendigkeit eines Zusatzes von NH_3 nicht, da bereits Spuren von Ammoniak, die bei einer normalen Enzymaufbereitung immer vorhanden sind, für den Phosphataustausch ausreichen. Es wurde daher die Bildung eines γ -Glutamylphosphates postuliert, das allerdings nicht isoliert werden konnte:



Der terminale Phosphatrest des ATP würde nach diesem Schema erst in der Endstufe, der Ammonolyse des Glutamylphosphats, frei. Sein Austausch gegen isotop markiertes Phosphat unter Bildung von radioaktivem ATP müßte dann den umgekehrten Ablauf der ganzen Reaktionsfolge (26,25,22) erfordern.

Messungen von Isotopenaustauschraten mit ^{14}C -Glutamat und ^{32}P -Phosphat, die BOYER (32) durchführte, wurden durch diese Hypothese gedeutet, daß die Gleichgewichtsaustauschraten von Reaktionsschritten kontrolliert werden, die nicht über kovalente Bindungen verlaufen.

Alle bisherigen Ergebnisse lassen jedoch auf eine Aktivierung an der γ -Glutamylcarboxylgruppe schliessen. Die

γ -Glutamylaktivierung findet nicht nur bei der Glutaminsynthese statt, sondern auch bei der Glutathionsynthese (s.o.) und der γ -Glutamyltranspeptidierung.

Dabei unterscheidet das Enzym nur quantitativ zwischen den beiden stereoisomeren Formen der Aminosäure. L-GluNH₂ wird bedeutend schneller gebildet als D-GluNH₂. Dagegen erfolgt die Synthese von D- und L- γ -Glutamylhydroxamat mit gleicher Geschwindigkeit. A. M e i s t e r schließt daraus aus (mindestens) 2 Reaktionsstufen mit verschiedener Stereospezifität:

- a) eine optisch unspezifische Aktivierung von Glutaminsäure und
- b) eine optisch spezifische Reaktion des aktivierten Zwischenproduktes mit NH₃.

Eine Beteiligung von SH-Gruppen an der Enzymreaktion leiteten SPECK und ELLIOTT (33,34) von einer Steigerung der Enzymaktivität ab, die sie bei Zusatz von Cystein oder Gluthation bei Rohextrakten beobachteten, sowie aus der Hemmbarkeit des Enzyms durch 10⁻³ M p-Mercuribenzoat.

Wie STAEBELIN und LEUTHARDT (35) zeigten, reagieren SH-Gruppen mit ATP direkt. Für diese Reaktion eröffnen sich 2 Möglichkeiten:



Isotopenaustauschversuche sprechen für eine Umsetzung nach Gleichung (27). Der primäre Reaktionsschritt wäre demnach eine Phosphorylierung des Enzyms durch ATP unter ADP-Abspaltung.

Für das postulierte Enzymphosphat wurden wiederum 2 Reaktionsmöglichkeiten diskutiert:



Es würde also entweder die Ausbildung von γ -phosphorylierter Glutaminsäure unter Enzymfreisetzung oder Austausch von Phosphat gegen Glutaminsäure am Enzymmolekül erfolgen. Versuche mit Glutaminsäure (29), die an der γ -Carboxylgruppe mit ^{18}O markiert war, ergaben ^{18}O -markiertes Phosphat. Die Autoren schlossen daher auf die Entstehung von γ -Glutamylphosphat (36).

Die enzymatische Bildung von Pyrrolidoncarboxylat (PC) unter bestimmten Reaktionsbedingungen, kann als weiterer Hinweis für das Vorliegen eines aktivierten Zwischenproduktes der Glutaminsäure gewertet werden. So konnte MEISTER (37) PC-Bildung nachweisen, wenn er 5 mg hochgereinigtes Schafhirnenzym (ammoniakfrei) mit ^{14}C -Glutamat, ATP und Mg^{++} , bei pH 7,2 1 min inkubierte und dann auf $55^{\circ}C$ erhitze. Kontrollversuche, die entweder mit inaktiviertem Enzym oder ohne Enzym durchgeführt wurden, zeigten nur eine geringe PC-Bildung. Ähnliche Versuchsergebnisse erhielten die Autoren bei Inkubationen ohne ATP oder Mg^{++} . Bekanntlich cyclisieren γ -Glutamylderivate beim Erhitzen schneller als Glutamin. So wird beispielsweise γ -Glutamylhydroxamat bei pH 7,0, $100^{\circ}C$ in 7,5 min zu PC umgewandelt, während unter gleichen Bedingungen nur weniger als 10% des Glutamins umgesetzt werden. Die Cyclisierungsgeschwindigkeit der γ -carboxylaktivierten Glutaminsäure ist etwa 600 mal höher, als die von Glutamin. Bei Zugabe von Ammoniak wird die PC-Bildung auf den Nullwert herabgesetzt und es entsteht Glutamin. Die Cyclisierungsraten für D- und L-Glutaminsäure erweisen sich als gleich groß. Zwei weitere experimentelle Befunde von MEISTER (37) sprechen für eine Bindung des aktivierten Zwischenproduktes an das Enzymprotein:

a) Versuche mit der Ultrazentrifuge

b) Ultrafiltration

Zu a) Man inkubierte ^{14}C -Glutaminsäure, ATP, Mg^{++} und ammoniakfreies Enzym, zentrifugierte in der Ultrazentrifuge und konnte feststellen, daß ein Teil der radioaktiven Substanz mit dem Protein sedimentierte. Der ^{14}C -Verlust des Überstandes entsprach der bei gleicher Enzymkonzentration bei den Hitzeversuchen gebildeten PC-Menge.

Zu b) Bei Ultrafiltration des Versuchsansatzes verblieb der entsprechende Betrag an ^{14}C -Glutaminsäure am Protein. In beiden Fällen zeigten Kontrollexperimente, d.h. Inkubation ohne ATP oder Mg^{++} mit inaktiviertem Enzym oder mit Ammoniak, keine Bindung von Glutaminsäure an das Enzym.

Zur Bestimmung von ADP und Phosphat, die bei diesen Versuchen aus ATP entstanden, mußte das Enzymprotein erst mit Äthanol oder Trichloressigsäure denaturiert werden. Der Arbeitskreis um A. M e i s t e r deutet dieses Ergebnis dahingehend, daß Phosphat und Nucleotid wie Glutaminsäure bei der Aktivierungsreaktion fest an das native Protein gebunden bleiben.

BUCHANAN und HARTMAN (38,39) diskutieren die Möglichkeit eines "concerted" Mechanismus, wie er bereits bei einigen nichtenzymatischen Reaktionen angenommen wird. Dabei müßte der nucleophile Ammoniak so reagieren, daß die Bindung vom Stickstoff- zum Kohlenstoffatom und vom Sauerstoff- zum Phosphoratom gleichzeitig erfolgt ohne Bildung von Zwischenprodukten.

TH. WIELAND, G. PFLEIDERER und B. SANDMANN (40) postulieren einen Synthesemechanismus, bei dem ATP vom Enzym in einer festen, wahrscheinlich homöopolaren Bindung, fixiert wird. Sie inkubierten γ - ^{32}P -markiertes ATP mit Enzym und trennten das überschüssige AT^{32}P durch Hochspannungselektrophorese in Stärke ab. Ein Teil der Radioaktivität blieb an

das Enzymprotein gebunden, die nach Elution als ATP^{32}P identifiziert werden konnte.- Enthält der Inkubationsansatz zusätzlich L-Glutamat, so blieb ebenfalls Radioaktivität mit dem Protein verbunden, die sich nach Hydrolyse größtenteils als anorganisches Phosphat erwies. ^{14}C -Glutamat wurde bei der Inkubation mit ATP und Enzym, das durch Dialyse und Dowex-50-Behandlung möglichst ammoniakfrei gemacht wurde, ebenfalls an das Protein gebunden. Eluierte man die Enzymbande aus der Stärkeschicht und fügte dem Eluat Ammoniak zu, so ließ sich Glutamin und Glutaminsäure im Verhältnis 4:4 nachweisen, während ohne NH_4^+ -Zusatz ein Verhältnis von 1:5 zu beobachten war.

Die angenommene homöopolare Bindung vom ATP zum Enzym würde die Kopplung dieses Vorganges mit einem energieliefernden Reaktionsschritt erfordern, wahrscheinlich mit der Spaltung eines zweiten ATP-Moleküls.

Daher wird folgender Mechanismus vorgeschlagen:

- 31.) $\text{E} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{E-P} + \text{ADP}$: Zündreaktion
- 32.) $\text{E-P} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{E-ATP} + \text{P}_{\text{an}}$: Austauschreaktion
- 33.) $\text{E-ATP} + \text{Glu} \rightleftharpoons \text{E-P-Glu} + \text{ADP}$: Aktivierungsreaktion
- 34.) $\text{E-P-Glu} + \text{NH}_3 \longrightarrow \text{E-P} + \text{GluNH}_2$: Synthesereaktion

Der erste Reaktionsschritt bestünde demnach in einer Phosphorylierung des Enzyms, bei der nur stöchiometrische ATP-Mengen verbraucht würden, die bilanzmäßig unwesentlich wären. Das phosphorylierte Enzym soll dann mit einer zweiten ATP-Molekel unter Ausbildung eines stabilen E-ATP-Komplexes reagieren (Gl. 32), der mit Glutaminsäure unter ADP-Abgabelung die "aktivierte Glutaminsäure" als das enzymgebundene γ -Glutamylphosphat (G.33) ergäbe. Bei Einwirkung von Ammoniak auf diesen Komplex sollte das Endprodukt Glutamin entstehen (Gl.34). Gleichzeitig würde dabei Enzymphosphat regeneriert,

das dann als der eigentliche Katalysator, für zahlreiche Wiederholungen der Reaktionsstufen (Gl. 32-34) zur Verfügung stünde. Wie Hemmversuche ergaben, kann als Bindungsstelle für das ATP oder P am Enzym eine SH-Gruppe angenommen werden.

Die oben dargestellten Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase gründeten sich auf die Ergebnisse der Dissertation von B. SANDMANN (41). Sie wurden weiter untermauert durch Untersuchungen, die A. DAHLINGER im Rahmen ihrer Doktorarbeit (42) am hiesigen Institut durchführte. Mit Enzympräparaten, die sie aus Erbsen anreicherte, wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die "Zündreaktion" (Gl.31) wurde durch die optische Bestimmung des bei Inkubation von Enzym und ATP freigesetzten ADP weiter bestätigt. Dabei wurde von ca. 53 Enzym-Einheiten 1.10^{-2} μMol ADP gebildet.
2. Die "Austauschreaktion" (Gl.32) ließ sich durch den Einbau von ^{32}P -Orthophosphat in ATP bei Abwesenheit von Glutaminsäure bekräftigen. Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion wurde zu nahe 1 gefunden. Für die Richtigkeit von Gl. 31,32 sprechen ferner Versuche mit α - ^{32}P -ATP, das fest an die Synthetase gebunden wurde. Nach Abtrennung des ATP-Überschusses mittels Filtration durch Sephadex-Dextrangel wurden auf je ca. 55 Enzym-Einheiten 0,01 μM gebundenes ATP gefunden.
3. Die "Aktivierungsreaktion" (Gl.33) wurde durch den Nachweis von ADP veranschaulicht, das auftritt, wenn das Enzym mit ATP und Glutaminsäure inkubiert wird. Die gefundenen ADP-Werte lagen annähernd doppelt so hoch, wie oben unter 1 gefunden. Versuche mit D, L- ^{14}C -Glutaminsäure ergaben nach Sephadex-Filtration einen Enzym-Glutamat-Komplex, bei dem nach Einwirkung von ADP fast nur ^{14}C -Glutaminsäure, bei der Reaktion mit Ammoniak überwiegend ^{14}C -Glutamin freigesetzt wurde.

4. Der durch Sephadexfiltration isolierte Enzym-Phosphat-Glutamat-Komplex sollte demnach mit der "aktivierten" Glutaminsäure identisch sein. Im Gegensatz zur Beschleunigung der Enzym-katalysierten Reaktion wurde er auch ohne Mg^{++} -Zusatz gebildet, sogar bei Anwesenheit von Fluorid oder Äthylendiamintetraacetat im Inkubationsansatz. Der "aktivier-te Komplex" ließ sich am besten bei pH 5,5 gewinnen.

5. Aus dem ATP-Bindungsvermögen und der stöchiometrischen ADP-Bildung einerseits, der spezifischen Enzymaktivität andererseits ließ sich das Vorliegen eines Wirkstellenäquivalents je 30.000 g Protein errechnen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die vorliegenden Befunde zu bestätigen, wobei einige Unklarheiten der Arbeit von Frau Dahlinger auszumerken waren. Insbesondere waren in 2 Versuchen mit β, γ - ^{32}P -ATP an Stelle von α - ^{32}P -ATP zur Überprüfung der "Zünd"- und der "Austausch"-Reaktion s.o. wesentlich geringere ATP-Mengen an das Enzym gebunden worden. Zur präziseren Feststellung des Verhältnisses zwischen katalytischer Enzymaktivität und stöchiometrischem Substrat-Bindevermögen war ferner der verwendete Enzymtest zu standardisieren. Schließlich sollten die einzelnen Reaktionen am Enzym nach ihren Michaelis-, Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten charakterisiert werden. Außerdem sollte die Glutaminsynthetase aus Erbsen mit der aus Hirn - die bisher meist-untersuchten Präparate - miteinander verglichen werden.

B. I. Darstellung der Glutaminsynthetase

Zur Durchführung dieser Untersuchungen benötigten wir beträchtliche Mengen möglichst reiner Glutaminsynthetase, die wir im wesentlichen nach ELLIOTT (26) aus Erbsen darstellten. Zum Vergleich isolierten wir auch Enzympräparate aus Schafhirn nach MEISTER (43).

a) Glutaminsynthetase aus Erbsen

Als Ausgangsmaterial benutzten wir Schalerbsen der sehr früh reifenden Importsorte "Vorbote". Die Erbsen müssen gut abgelagert sein, am besten 1 Jahr. Bei Verwendung von frischen Früchten erschwert ihr hoher Mucin-Gehalt die Aufarbeitung außerordentlich. Im übrigen liefert die Vorschrift von Elliott in den ersten Stufen recht brauchbare und reproduzierbare Ausbeuten. Sie umfaßt nach Extraktion der feingemahlten Erbsen mit Natriumcarbonatlösung eine Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat, die Abtrennung eines noch nicht identifizierten Hemmstoffs mit Protaminsulfat, Nucleinsäurefällung und Fraktionierung mit Ammoniumsulfat. Größere Enzymverluste traten dagegen (wie auch bei SANDMANN (41) und DAHLINGER (42)) bei der folgenden Dialyse (Aktivitätsabnahme ca. 25%) und der 2. Nucleinsäurefällung (Aktivitätsabnahme ca. 50%) auf. Zudem erweist sich die Glutaminsynthetase nach diesem Reinigungsschritt als ziemlich instabil.

Zur weiteren Reinigung erprobten wir daher die Adsorption und fraktionierte Desorption des Enzyms mit Phosphatgel, das nach KEILIN und HARTREE (44) dargestellt wurde. Während relativ rohe Enzympräparate nur teilweise auf das Gel aufgezogen und nach der Elution kaum eine Anreicherung zeigten, liessen sich reinere Fraktionen mit spezifischer Aktivität ab 20 Einheiten/mg recht befriedigend behandeln. Durch die gleiche Trockengewichtsmenge an Gel wird praktisch alles Enzym gebunden. Durch vorsichtiges Waschen des Gels mit 1/10 und 1/5 molarem Phosphatpuffer wird nur wenig Enzym freigesetzt, die Hauptmenge erst durch 1/2 molaren Puffer. Die Reinigung betrug das 3 bis 4 fache, die Ausbeute über 75%. Als weiteres Adsorptionsmittel erprobten wir Hydroxylapatit, der sich aber etwas schlechter eignete.

In beiden Fällen mußte die Proteinlösung zur Adsorption entsalzt werden, wobei die oben beschriebenen Dialyseverluste auftraten.

Wenig Erfolg erbrachten auch Versuche, das Fremdprotein durch einen Hitzeschritt abzutrennen, wobei wir versuchten, die Glutaminsynthetase mit ihrem Substrat ATP (unter Mg^{++} -Zusatz) zu schützen.

Wie Abb. 4 zeigt, wird auch das Erbsenenzym durch diesen Zusatz hitzebeständiger.

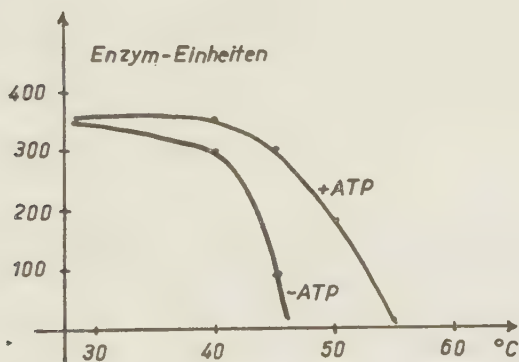


Abb. 4

Man kann es z.B. 20-30 min auf $45^{\circ}C$ erhitzen, wobei das nicht geschützte Enzym weitgehend inaktiviert wird. (Abb.5)

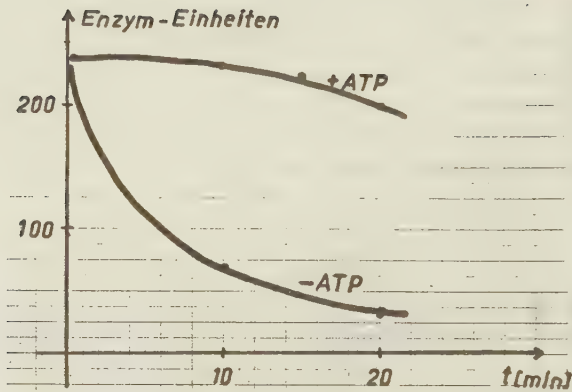


Abb. 5

Leider ist die Glutaminsynthetase offenbar immer noch eines der instabilsten Proteine: Die Lösung trübt sich erst dann, wenn auch die Enzymaktivität abnimmt; die spezifische Aktivität bleibt ziemlich konstant.

Als beste und einfachste Reinigungsmethode bewährte sich noch 2 bis 3 malige Fraktionierung mit Ammoniumsulfat. Sie lieferte uns die aktivsten Präparate mit einer spezifischen Aktivität von ca. 230 Einheiten/mg. Ein typisches Aufarbeitungsschema zeigt Tabelle 1.

Reinigung von Glutaminsynthetase aus Erbsen:

Schritt	Enzym-Einheiten/ml	Protein (mg)/ml	Gesamt-einheiten	Spez. Aktiv.
1. Extraktion	-	14,5	-	-
2. Am.s.-Fällung	23	31	41.200	0,74
3. Protamins.f.	16	20	42.000	0,80
4. Nucleins.f.	141	24,7	22.600	5,7
5. 1.Am.s.frakt. (1,47-1,85 m)	895	26,7	16.100	33,5
6. 2.Am.s.frakt. (1,50-1,80 m)	815	13,5	14.000	60,0
7. 3.Am.s.frakt. (1,55-1,80 m)	1857	11,5	13.800	161
8. 4.Am.s.frakt. (1,55-1,75 m)	2131	9,2	12.800	231

Tab. 1

b.) Glutaminsynthetase aus Schafshirn

Wir stellten das Enzym entsprechend den Angaben von MEISTER (43) dar. Das Verfahren ist gut reproduzierbar und umfaßt folgende Schritte:

Reinigungsschritt	EE/ml	Prot./ml (mg)	Gesamt-einheiten	Spezif. Aktivit.
1. Homogenat	ca.4,5	90	ca. 15.000	ca.0,05
2. Extraktion	28	31,5	40.000	2,7
3. pH 4,2 Fällung u.				
4. Extraktion	92	15,4	32.000	6,0
5. Hitzeinaktiv.	265	10,2	28.000	26,0
6. pH-Fraktionierung	418	8,5	21.000	49,0
7. Ammoniumsulfatfraktionierung	915	6,3	16.000	145

Tab. 2

II. Synthesen von radioaktiv-markierten Adeninnucleotiden

Zum Studium des Reaktionsgeschehens bei der enzymatischen Glutaminbildung, war es notwendig Verfahren auszuarbeiten, die es gestatteten, verschiedene ^{32}P -markierte ATP-Präparate hoher spezifischer Radioaktivität mit möglichst guten Ausbeuten herzustellen.

a) β - ^{32}P -ATP:

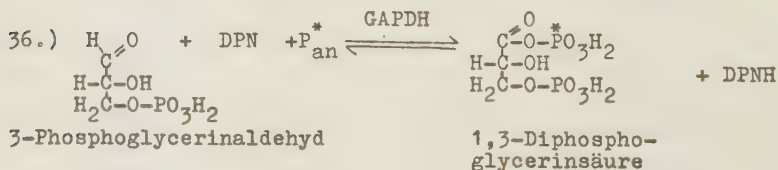
Zur Synthese von β - ^{32}P -markiertem ATP benutzten wir die enzymatische Reaktion der Aminosäureaktivierung, die nach HOAGLAND (9) unter ATP-Pyrophosphat-Spaltung abläuft:

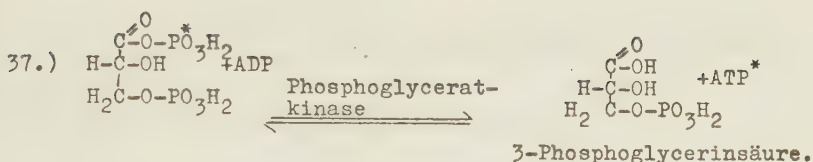


Diese Austauschreaktion wird von einem teilweise gereinigten Rattenleberhomogenat katalysiert, das lysin-, valin- und leucinaktivierendes Enzym enthält (45). Das radioaktive Pyrophosphat gelangt durch obige Umsetzung in das ATP-Molekül, das - nach Entfernung des Proteins durch kurzes Erhitzen - auf der Hochspannungselektrophorese präparativ abgetrennt und von den Begleitsubstanzen gereinigt wurde. Bei den meisten Ansätzen war zur zufriedenstellenden Sauberkeit des AdP-P-P ein zweimaliges Elektrophorieren nötig.

b) γ - ^{32}P -ATP:

Die Darstellung von γ - ^{32}P -markiertem ATP wurde nach der Vorschrift von G. PFLEIDERER (46) durchgeführt. Sie verläuft nach folgenden enzymatisch katalysierten Umsetzungen:

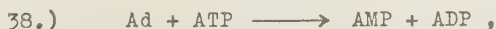




Die Umsetzung läßt sich optisch durch Messung der Extinktionszunahme des beim ersten Reaktionsschritt entstehenden DPNH bei 366 mμ verfolgen. Setzt man trägerfreies ^{32}P -Phosphat dem Inkubationsansatz zu, der außer Puffer noch Mg^{++} enthält, so wird energiereiches Phosphat auf ADP unter Bildung von endständig markiertem ATP übertragen. Der unbeständige Trioseester wurde erst im Inkubationsansatz aus gereinigtem Fruktose-1,6-Diphosphat durch Aldolase gebildet oder vorher aus Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthylacetal durch saure Hydrolyse freigesetzt. Nach dem Enteiweißen wird der Ansatz an säurebehandelter Aktivkohle adsorbiert, das nichtumgesetzte Phosphat mit Wasser und anschliessend das gebildete ^{32}P -ATP mit einem Wasser-Äthanol- NH_3 -Gemisch eluiert. Durch Hochspannungselektrophorese kann eine weitere Reinigung durch Abtrennung von ADP-Resten erzielt werden.

c) ^{32}P -AMP:

EGGLESTONE (46) berichtete 1954 über eine elegante Methode zur Herstellung radioaktivmarkierter Nucleotide unter Verwendung eines Reaktionsgemisches aus: Adenosin, ATP, ^{32}P -Orthophosphat und Lebedew-Saft (einem Autolysat aus Bierhefe), der vor der Inkubation möglichst phosphatfrei gemacht wurde. Die im Lebedew-Saft enthaltenen Enzyme katalysieren die Phosphorylierung des Adenosins nach:



den Austausch des terminalen Phosphatrestes des ATP gegen

isotop markiertes Orthophosphat nach:



sowie die Myokinasereaktion:



Im Idealfall völligen Reaktionsablaufs ist das Reaktionsprodukt ein Gemisch von Adenin-Nucleotiden (AMP, ADP und ATP) zu erwarten, in dem jeder Phosphatrest die gleiche spezifische Radioaktivität aufweist.

Um eine maximale spezifische Radioaktivität zu erreichen, ist die möglichst weitgehende Entfernung von anorganischem Phosphat aus dem Bierhefeautolysat, in dem es in beträchtlichen Mengen vorliegt, notwendig. Sie gelang uns mit Hilfe der Gel-filtration durch Sephadex-G-50 (L3). Dabei erreichten wir bedeutend niedrigere Phosphatwerte als durch Ausfällung von Ammonium-Mg-Phosphat (L1) oder durch Adsorption an Dowex 1 (L2). Eine Zusammenstellung der Phosphatwerte, wie sie nach den eben genannten Methoden erzielt wurden, zeigt Tabelle 3. (Lo= unbehandelter Lebedews.)

Tab.3: Phosphatgehalt verschieden dargestellter Hefeautolysate

	Lo	L1	L2	L3
mg PO_4^{3-} /ml	2,9	0,097	0,414	0,011
mg Protein/ml	48,7	32,2	20,5	20,1

Die Phosphatbestimmung wurde nach 52) als Ammonium-phosphomolybdat durch Extinktionsmessung bei 578 mμ nach Reduktion zu Molybdänblau durchgeführt. Der Vorteil der Gel-filtration besteht nicht allein in der schnelleren Abwicklung des Arbeitsvorganges, sondern vor allem in der schonenderen

Behandlung des Enzymgemisches. Es wurde jeweils die erste Eiweißfraktion abgefangen, die nur eine geringfügige Verdünnung durch bidest. Wasser oder m/10 Tris-Puffer als Elutionsmittel erleidet.

Wir inkubierten phosphatfreien Lebedew-Saft, Adenosin, ATP, K-Acetat und ^{32}P -Phosphat, liessen den Ansatz etwa 15 Stunden bei Zimmertemperatur reagieren, enteweißten und trennten dann die Nucleotide auf der Hochspannungselektrophorese. AMP, ADP und ATP liessen sich durch ihre UV-Absorption erkennen und anhand eines mitgelaufenen Gemisches aus den Vergleichssubstanzen leicht identifizieren. Die Einbaurate wurde durch Messung der Radioaktivität der einzelnen Banden bestimmt, Mg-ionen setzten wir dem Inkubationsansatz erst bei einer zweiten Enzymzugabe 10 Stunden nach Inkubationsbeginn zu. Beim ersten Ansatz reicht eine geringe Mg^{++} -Konzentration, die mit dem Protein verbunden zu sein scheint, aus, um die nötige Aktivierung der Enzyme sicherzustellen.

Das Verhältnis des ^{32}P -Einbaues in die Adeninnucleotide war bei den verschiedenen Ansätzen nie streng reproduzierbar, sondern schwankte bis zu 40%. Diese Erscheinung dürfte z.T. auf eine Verschiebung der Enzymaktivitäten des Lebedew-Saftes zurückzuführen sein, verursacht durch die Vorbehandlung dieses Enzymgemisches oder durch längere Lagerzeiten bei 0°C , bzw. in eingefrorener Lösung- beim Einfrieren und Auftauen.

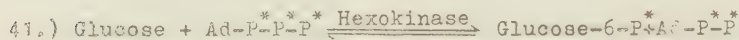
Die Tabelle 4 zeigt ein typisches Beispiel eines Inkubationsversuchs, wie zuvor erläutert:

<u>Tab.4</u>	AMP	180.000	Imp/min
	ADP	390.000	"
	ATP	320.000	"
	PO_4^{3-}	900.000	"

Der "Papierwert" (d.h. der Blindwert einer gleichgroßen Papierzone zwischen den einzelnen Nucleotidbanden, bedingt

durch Salze oder Proteinreste, die ein schwaches Verschmieren der Banden verursachen können) betrug bei obigem Ansatz etwa 14.000 Imp/min.

Zur Erhöhung der ^{32}P -AMP-Ausbeute machten wir uns die Enzymreaktionen mit Hexokinase und Myokinase zunutze:



Da beide Enzyme durch Mg^{++} aktiviert werden, ist vorheriger Mg^{++} -Zusatz notwendig. - Nach dem Enteiweißen wurde der Ansatz wieder elektrophoretisch aufgetrennt und die Radioaktivität gemessen. Tab. 5 zeigt die durch die Umsetzungen 41 und 42 bewirkten Veränderungen der Nucleotidzusammensetzungen:

AMP	220.000	Imp/min
ADP + G-6-P	210.000	"
ATP	43.000	"
PO_4^{3-}	700.000	"

Tab. 5

Nach obiger Umsetzung betrug der Papierwert zwischen ADP und ATP etwa 100.000 Imp./min. Er ist wahrscheinlich auf ^{32}P -markiertes Glucose-6-Phosphat zurückzuführen, das im Pherogramm (Abb. 6) etwas weiter als ADP läuft.

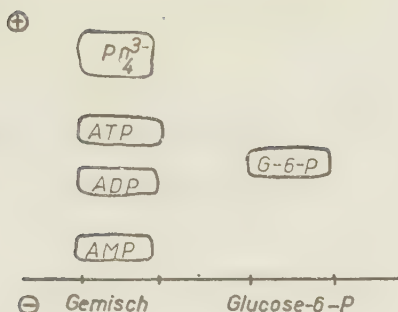


Abb. 6

Den enteweißten Inkubationsansatz trennten wir auf einer Dowex-1-Säule. Die AMP-Elution erfolgte mit 0,5 n Ameisensäure und der Nucleotidgehalt der Fraktionen wurde durch Messung der Absorption bei 260 m μ am Zeiss-Spektrophotometer ermittelt. Das Eluat engten wir durch Gefriertrocknung ein undelektrophoriertennochmals. Die Auftrennung der Nucleotide nach Dowex-1-Behandlung zeigt Tabelle 6. Der Papierwert des Pherogramms betrug 110 Imp/min.

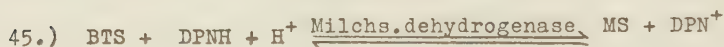
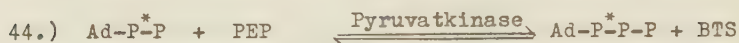
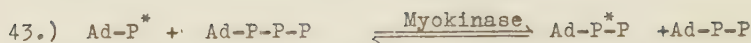
AMP	25.345	Imp/min
ADP	501	"
ATP	474	"
PO ₄ ³⁻	2.178	"

Die radioaktive AMP-Bande wurde aus dem Pherogramm ausgeschnitten, eluiert, durch Gefriertrocknung eingengt und die spezifische Radioaktivität ermittelt.

d) α -³²P-ATP:

Das so dargestellte ³²P-AMP (AdP*) setzten wir unter Ausnutzung folgender enzymatischer Reaktionen zu α -³²P-ATP (Ad-P*-

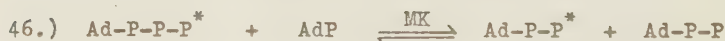
P-P) um.



Dazu wurden Phosphenolbrenztraubensäure, ATP, Mg^{++} , DPNH, AMP^* und die drei Enzyme in Pufferlösung von pH 7,0-7,5, 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert, danach enteiweißt, eingeengt und auf der Hochspannungselektrophorese (Citrat-Puffer, pH 4,2) in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Die ATP-Bande eluierten wir mit Wasser und prüften mit einem weiteren Pherogramm auf die Vollständigkeit der erzielten Trennung der Nucleotide.

e.) β - ^{32}P -ADP:

Zur Darstellung von β - ^{32}P -ADP benutzten wir γ - ^{32}P -ATP, das mit Hilfe von Myokinase in terminalmarkiertes ADP umgewandelt wurde:



Der Inkubationsansatz enthielt neben Tris-Puffer, pH 7,2, γ -ATP, AMP Mg^{++} und Myokinase. Nach 20 min Inkubation unterbrachen wir die Reaktion durch Hitzedenaturierung und elektrophorierten anschließend das Gemisch. Die radioaktive ADP-Bande wurde dann anschließend aus dem Pherogramm eluiert und die spezifische Aktivität des Nucleotids bestimmt.

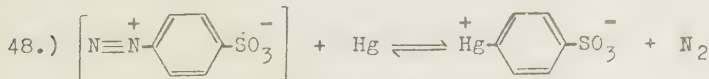
III.) Darstellung von ^{35}S -p-Chloromercuriphenylsulfonat (MPS)

Quecksilberorganische Verbindungen spielen bei Untersuchungen über die Beteiligung proteingebundener Thiolgruppen an den enzymkatalysierten Reaktionen eine wesentliche Rolle. Namentlich mit p-Mercuribenzoat wurde eine Vielzahl von Enzymen der verschiedensten Klassen als SH-Enzym erkannt. Die von BOYER (46) gefundene Erhöhung der Lichtabsorption bei Mercuribenzoat-Bindung im ultravioletten Spektralbereich (gemessen wird meist bei 255 mμ) erlaubt auch die Bestimmung der Anzahl der reagierenden Mercaptanfunktionen. Ähnlich fest wie das p-Mercuribenzoat wird auch das p-Mercuriphenylsulfonat von Thiolen gebunden. Die Gleichgewichtskonstanten liegen hier für beide Reagentien meist in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-6} . Um den SH-Gehalt der Glutaminsynthetase möglichst genau messen zu können, synthetisierten wir ^{35}S -p-Chloromercuriphenylsulfonat (MPS*) nach einem eigenen Verfahren (47), das es ermöglicht, auch kleine Substanzmengen schonend zu mercurieren.

Wir gingen von ^{35}S -Sulfanilsäure aus, die wir vom Radiochemical Centre, Amersham/England bezogen. Sie läßt sich auch in kleinen Mengen (< 100 mg) mit guter Ausbeute (> 75%) diazotieren:



Das isolierte innere Diazoniumsalz wird mit fein ver-
teiltem metallischem Quecksilber umgesetzt nach:



Die zur Reaktion erforderliche wässrige Suspension von Quecksilber wird meist durch Reduktion von Sublimat mit Zinnchlorür hergestellt: $\text{HgCl}_2 + \text{SnCl}_2 \longrightarrow \text{Hg} + \text{SnCl}_4$. Das entstehende Sn^{4+} -Salz wird nach Beendigung der Reaktion

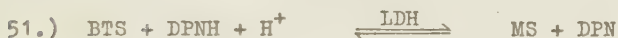
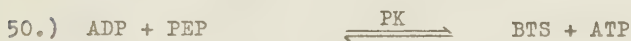
durch Neutralisieren mit Hydroxyd ausgefällt. Die sehr voluminöse Fällung bindet das gebildete Mercuriphenylsulfonat sehr fest, es ließ sich schlecht auswaschen. Die Ausbeute lag bei Einsatz geringer Diazoniumsalzmengen bei ca. 5%. Ausbeuten bis zu 25% erhielten wir dagegen, wenn wir die Quecksilbersuspension mechanisch erzeugten. Die wässrige Diazoniumsalzlösung wurde dazu in einem dickwandigen Glasrohr mit Quecksilber unterschichtet, in die Grenzschicht der relativ eng passende Glasstempel eines Vibromischers eingeführt und so intensiv gemischt, daß sich die wässrige Phase tief dunkelgrau färbte. Die besten Resultate lieferten Ansätze, die bei tiefer Temperatur - erst Eiskühlung, dann 20°C - reagiert hatten. Nach ca. 50 Stunden Reaktionsdauer war alles Diazoniumsalz umgesetzt, es kuppelte nicht mehr mit β -Naphthol. Das Produkt kristallisierte als Hydrochlorid aus seiner wässrigen Lösung. Die Reinheit des Präparats wurde nach verschiedenen Methoden bestimmt:

<u>Methode:</u>	<u>% der Einwaage:</u>
1. Extinktionsmessung = 264 μ	97
" = 243 "	104
" = 223 "	107
2. Cysteinreaktion nach BOYER (46)	94
3. LDH-Inaktivierung- u. Reaktivierung (48)	93
4. Messung der spezifischen Radioaktivität	93

IV. Optische Versuche

a) Der optische Test:

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein gekoppelter, optischer Test benutzt (41,42), der sich sowohl bei der Überprüfung der Enzymaktivität während des Aufarbeitungsganges, als auch bei Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus sehr gut bewährte. Er beruht auf den folgenden Umsetzungen:



Das bei der Glutaminsynthese freigewordene ADP wird durch die Pyruvatkinasereaktion zu ATP rephosphoryliert. Die Lactatdehydrogenase hydriert die dabei äquimolar entstandene Brenztraubensäure zu Milchsäure. Dabei wird eine dem in 49.) freigesetzten ADP proportionale Menge an DPNH verbraucht. Da die je Zeiteinheit gebildete ADP-Menge der Enzymkonzentration proportional ist, erhalten wir durch diesen gekoppelten Test eine direkte Beziehung zu den eingesetzten Enzymeinheiten. Bei 366 mμ kann man mit dem Photometer "Eppendorf" die Abnahme der DPNH-Konzentration optisch verfolgen. Es wird die Zeit gemessen, die für die Extinktionsabnahme von 0,1 benötigt wird. Sie ist der Enzymkonzentration umgekehrt proportional.

Wir berechneten die Anzahl der Enzymeinheiten (EE) pro ml Glutaminsynthetaselösung nach BÜCHER et al (49):

$$52.) \quad \text{EE/ml} = \frac{100 \times \text{Testvolumen (ml)}}{\{(\text{sec}) \times \text{einpipett. Enzymmenge (ml)}\}}$$

Da eine ganze Reihe von Faktoren außer der eigentlichen Enzymreaktion eine DPNH-Abnahme bewirken können - z.B.

ATPasen oder ADP in den Reagentien- wurde von uns die eigentliche Synthetasereaktion erst durch Zugabe von Glutaminsäure zum Testgemisch ausgelöst. Der vor der Glutaminzugabe gemessene "Blindgang" muß natürlich vom gemessenen Aktivitätswert abgezogen werden, um den "wahren" Aktivitätswert zu erhalten.

Die Messung der Enzymaktivität in diesem gekoppelten optischen Test ist sehr empfindlich gegen Temperatur- und pH-Schwankungen. Abbildung 7 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Glutaminsynthetase und des Blindgangs:

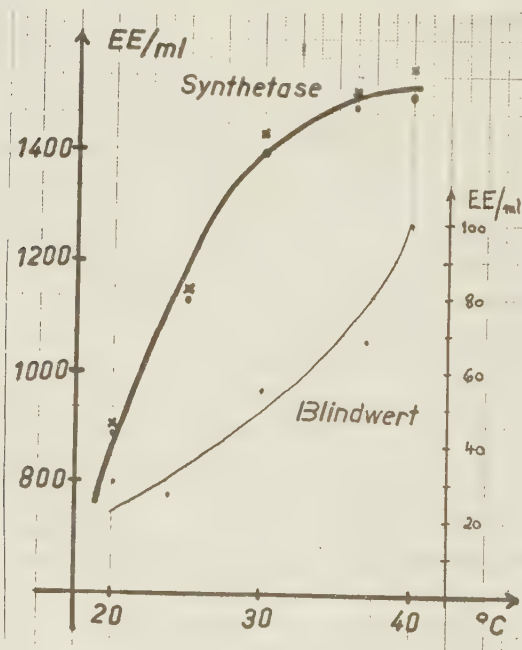


Abb. 7

Die Zunahme beider Aktivitäten im Gebiet zwischen 18 und 27°C, in welchem Bereich bisher ohne Temperaturkonstanz gemessen wurde, beträgt an die 100%. Durch Verwendung eines

temperierbaren Küvettenhalters und Temperatureinstellung der verwendeten Lösungen wurden alle im folgenden ausgeführten Bestimmungen der Synthetaseaktivität bei möglichst genau 25°C durchgeführt ($\pm 1/2^\circ\text{C}$). Gegenüber den Aktivitätsmessungen, die A. DAHLINGER (42) meist bei ca. 20°C durchführte, ergäbe diese konstante Temperatur um etwa 50% höhere Aktivitätswerte.

Wegen der ausgeprägten pH-Abhängigkeit dieser enzymatischen Reaktionen (siehe Abb. 8) wurden die im Testansatz verwandten Lösungen mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt; auch besaß der beim gekoppelten Enzymtest benutzte Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 eine genügend starke Pufferkapazität. Die pH-Konstanz der Testlösung überprüften wir außerdem laufend in der Testküvette mit dem pH-Meter (Mikroelektrode).

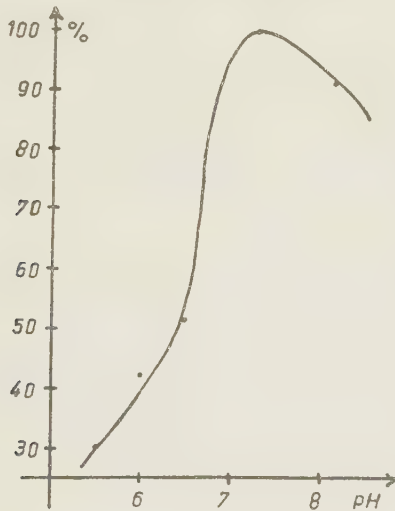


Abb. 8

Andere Testmöglichkeiten.

Neben diesem gekoppelten optischen Test gibt es noch weitere Möglichkeiten zur Aktivitätsbestimmung der Glutamin-

synthetase. So ermittelte W.H. ELLIOTT (22) die Aktivität seiner Präparate durch Bestimmung der Phosphatmenge, die bei Ablauf der Glutaminsynthese unter optimalen Konzentrationsbedingungen innerhalb von 10 Minuten aus dem ATP freigesetzt wird.

A. MEISTER (25) gebrauchte die enzymatische Bildung von γ -Glutamylhydroxamsäure als Bestimmungsgröße, die analog der Glutaminsynthese bei Inkubation bei Hydroxylamin an Stelle von Ammoniak eintritt. Nach seiner Definition bildet 1 Enzymeinheit in 15 Minuten bei 37°C $1\mu\text{Mol}$ γ -Glutamylhydroxamat, das durch photometrische Bestimmung seines rotgefärbten Eisenkomplexes erfaßt wird. Zum Vergleich mit den B ü c h e r - Einheiten unserer Versuche testeten wir unser Enzympräparat auch nach dieser Methode.

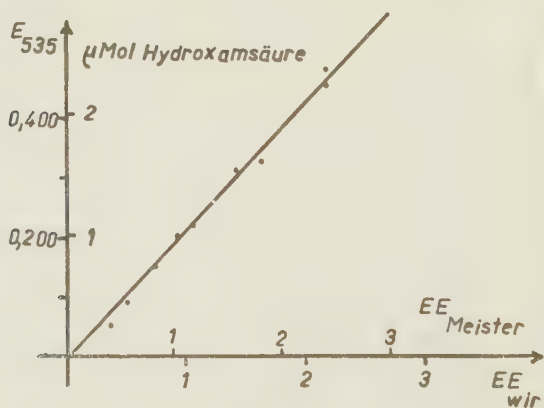


Abb. 9

Wie Abb. 9 zeigt, bildet eine Enzymeinheit unter den Bedingungen von A. MEISTER (43) $1,1\mu\text{Mole}$ Glutamylhydroxamat, d.h.

$$EE_{\text{Meister}} : 1,1 = EE_{\text{wir}}$$

b.) Optische Bestimmung der Zündreaktion:

Nach Gleichung 31 nahmen WIELAND et al. (40) vor der eigentlichen Synthetase-Reaktion eine Phosphorylierung des Enzymproteins an, wahrscheinlich an Sulfhydrylgruppen, deren katalytische Bedeutung (41) durch Hemmversuche nachgewiesen wurde.- Mit Hilfe eines optischen Testes gelang es (42) diese als " Zündreaktion " bezeichnete Umsetzung direkt sichtbar zu machen und messend zu verfolgen. Dieser Test beruht auf den gleichen enzymatischen Reaktionen, die wir für die Aktivitätsbestimmung verwendeten:



Es wird also im Photometer bei 366 mμ die DPNH-Abnahme gemessen, die der entstandenen ADP-Menge proportional ist.

Bei der Zündreaktion sollte es sich um einen einmaligen Phosphorylierungsvorgang der aktiven Zentren des Enzyms handeln, d.h. es würden stöchiometrische Mengen von ATP gespalten, die im Hinblick auf die katalytische Glutaminsynthetase-Reaktion bilanzmäßig nicht ins Gewicht fielen. Diese Annahme verdient deutlich hervorgehoben zu werden, da sie in der Literatur unrichtig interpretiert wurde (49). Die in (42) erhaltenen Werte von 53 Wirkstellenäquivalenten mußten korrigiert werden, da wir unseren Aktivitätstest, wie bereits erwähnt, standardisierten.

Wir ließen die Zündreaktion bei 25°C und bei pH 7,2 oder 5,5 ablaufen. Den niedrigen pH-Wert wählten wir, um die den "Nullgang" verursachenden Mg^{++} -abhängigen alkalischen Phosphatasen und ATPasen weitgehendst auszuschalten, was allerdings nur begrenzt möglich war. Da wir sowohl im neutralen,

wie auch im saueren Milieu unter denselben Testbedingungen etwa die gleichen Werte für die je Enzymeinheit aktiven Wirkstellenäquivalente erhielten, dürfte die Zündreaktion weitgehend pH-unabhängig sein. Nach ELLIOTT (26) erreicht dagegen das Enzym bei pH 5,5 nur etwa $1/3$ der maximalen Aktivität bei pH 7,2 der Gesamtreaktion.

Es wurde eine große Anzahl von Testen ausgeführt, bei denen wir zur Vermeidung möglicher Fehlerquellen, die sich bei empfindlichen gekoppelten Testen leicht einstellen, den Einfluß der Reihenfolge der Reagentien und Hilfsenzyme auf den Ablauf der Zündreaktion beobachteten. Es erwies sich am vorteilhaftesten, die Zündreaktion durch ATP auszulösen, nachdem man zuvor die Hilfssubstanzen, bzw. deren geringfügige Verunreinigungen, abreagieren ließ. Der geringe ADP-Gehalt des ATP wurde getrennt bestimmt und von dem beobachteten Extinktionsabfall abgezogen. In den Fällen, wo wir die Zündreaktion durch Zugabe der Glutaminsynthetase starteten, wurde analog die Eigenextinktion der Enzympräparate berücksichtigt, die wahrscheinlich auf Streueffekten beruht. Ein charakteristisches Bild der Zündreaktion zeigt Abb. 10.

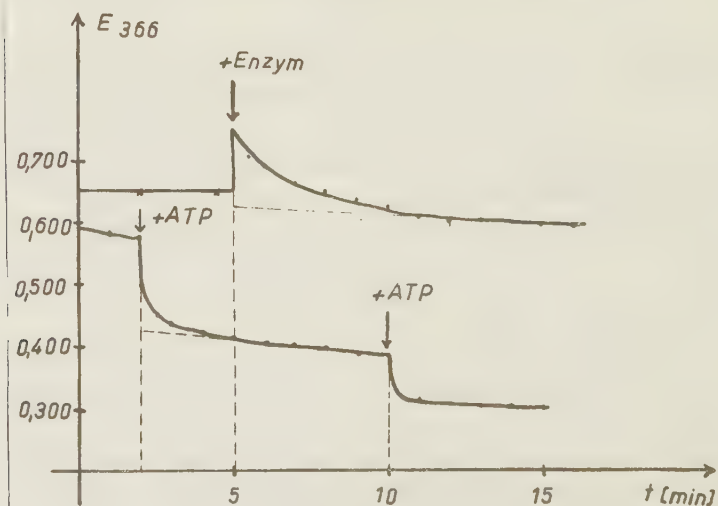


Abb. 10

Bei Verwendung unserer reinsten Synthetasepräparate, mit einer spezifischen Aktivität von 100-230 EE/mg erhielten wir im Mittel für 80-85 Enzymeinheiten 0,01 μ Mol Wirkstellenäquivalente. Es wurden demnach also bei der Zündreaktion von 80-85 Enzymeinheiten der Synthetase 0,01 μ M ATP in ADP gespalten. Eine Zusammenstellung der gefundenen Werte zeigt Tabelle 7.

No	Eingesetzte EE	Wirkstellen- äquivalente	Enzymeinheiten je 0,01 μ M Wirkstellen- äquivalente.
----	-------------------	-----------------------------	--

a.) bei pH 7,2

1	370	0,061 μ M	63
2	460	0,051 "	91
3	370	0,045 "	83
4	370	0,047 "	79
5	210	0,031 "	70
6	215	0,021 "	100
7	105	0,012 "	85
8	157	0,018 "	87
9	320	0,044 "	72
10	320	0,037	<u>83</u>

$\bar{M}$: 82 EE für 0,01 μ Mol
Wirkstellenäquivalente

b.) bei pH 5,5

1	220	0,0274 μ M	80
2	103	0,0125 "	<u>83</u>

$\bar{M}$: 82 EE für 0,01 μ Mol
Wirkstellenäquivalente

Tab. 7

Eine große Schwierigkeit, die Zündreaktion quantitativ zu bestimmen, liegt in der Erfordernis von streng identischer

Enzymprotein, da z.B. bereits die "Beschädigung" einer von 10 aktiven SH-Gruppen im Proteinmolekül einen Fehler von 10% ausmachte. Nur geringe unbeabsichtigte Veränderungen bei der Enzymaufbereitung, verschieden lange Lagerzeiten, öfteres Auftauen bzw. Einfrieren der Enzympräparationen könnten die Ursache für partielle Veränderungen der Anzahl bzw. der Reaktivität der aktiven, freien SH-Gruppen sein.

So erhielten wir mit Enzympräparaten geringerer spezifischer Aktivität (ca. 50-100 EE/mg) eine wesentlich stärkere Streuung der gefundenen ADP-Werte. Freisetzung von 0,01 μMol ADP erfordert hier unreproduzierbar zwischen 50-500 Enzymeinheiten. Bei einigen unreineren Synthetasefraktionen war schließlich die Zündreaktion überhaupt nicht mehr meßbar.

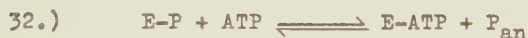
Diese schlechte Reproduzierbarkeit könnte darauf beruhen, daß die Präparate von der Aufarbeitung her unterschiedliche Mengen an ATP oder ADP und Phosphat gebunden halten. Dies scheint nach Befunden von MEISTER (49) vor allem für das Schafshirnenzym zuzutreffen. Ein wesentlicher Schritt zu einer Reinigung besteht ja in einer Erhitzung des mit ATP und Mg^{++} geschützten Enzyms. Meister berichtet, daß es auch nach der Endreinigung durch Elektrophorese wechselnde Mengen einer UV-Licht von 260 $\mu\mu$ absorbierenden Substanz enthielt. Entsprechend konnten wir mit Hirnpräparaten kaum eine Zündreaktion nachweisen. (0,01 μMol ADP wurden erst von über 500 EE gebildet).

Wenn die Zündreaktion tatsächlich auf einer Phosphorylierung von proteingebundenen aktiven SH-Gruppen beruht, so müßten gebundene Phosphat- und ATP-Reste durch Mercuriverbindungen vom Enzym verdrängt werden können. Wir inkubierten hierfür verschiedene Synthetasefraktionen mit p-Chloromercuriphenylsulfonat. Das Enzym wurde innerhalb einer 1/2 Stunde in 10^{-3} molarer MPS-Lösung praktisch völlig gehemmt. Es ließ sich mit m/10 Cystein in kurzer Zeit ebenso völlig reaktivieren. Die Ausgangsaktivität wurde fast stets wieder erreicht. Eine Zunahme der Zündreaktion von ca. 400EE/0,01 μMol ADP auf 50 EE pro 0,01 μMol wurde dagegen nur einmal

beobachtet. In allen anderen Fällen lag sie in derselben Größenordnung, wie wir sie für das unvergiftete Enzym (auch nach Cysteinbehandlung) fanden.

c.) Hemmbarkeit der Glutaminsynthetase durch Phosphat.

Nach dem von WIELAND u.a. (40) aufgestellten Reaktionsschema sollte auf die Zündreaktion eine Austauschreaktion folgen:



Das phosphorylierte Enzym sollte dann während der weiteren Reaktionsstufen laufend nachgebildet werden. Diese Austauschreaktion wurde von A. D a h l i n g e r an Hand von Isotopenversuchen als umkehrbar erkannt, die Gleichgewichtskonstante zu ca. 1 bestimmt. Wenn dieser Befund zutrifft, so müßte die im optischen Test bestimmbare Enzymaktivität auch von der Phosphatkonzentration der Ansätze abhängen. Mit steigendem Phosphatgehalt müßte sie abnehmen, da dann im stationären Gleichgewicht immer mehr E~P neben dem zur weiteren Reaktion benötigten E~ATP vorliegen sollte. Diese Hemmbarkeit durch Phosphat konnten wir tatsächlich nachweisen. Bei dieser ATP-Konzentration von 3 µMol/ml betrug sie für:

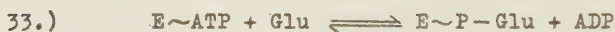
Phosphatkonzentration	Gefundene Enzymeinheiten/ml	%-Hemmung
0	466	0
1/10 m	350	25
1/6 m	280	40
1/3 m	130	72
1/2 m	111	76
1 m	73	84

Tab. 8

Halbmaximal war sie also für ca. 0,18 m. Aus dem Verhältnis $\text{ATP} / \text{P} = 3/180$ würde sich aber als Gleichgewichtskonstante $K = 0,017$ ergeben.

d.) Optische Bestimmung der Aktivierungsreaktion.

Auf die Austauschreaktion sollte dann die Aktivierungsreaktion folgen:



Auch das hierbei freiwerdende ADP konnten wir in einigen Fällen an dem Sprung der Extinktion im gekoppelten optischen Test bestimmen, der auf Zusatz von Glutaminsäure nach Inkubation des Enzyms mit ATP auftrat. Die Menge des pro 0,01 μMol ADP-Freisetzung benötigten Enzyms schwankte aber noch stärker als in der Zündreaktion. Wir fanden Werte zwischen 80 und 700 EE/0,01 μMol bei pH 5,5. Dieses niedrige pH war zur Zurückdrängung der Brutto-Glutaminsynthese erforderlich.

V. Isotopeneinbauversuche

a) Mg^{++} -Abhängigkeit der Glutaminsynthese.

Die Abhängigkeit der Glutaminbildung von Mg^{++} -Ionen konnten auch wir eindeutig nachweisen. Dazu inkubierten wir pro Testansatz 5 Enzymeinheiten der Synthetase mit Imidazol-Puffer, pH 7,2, NH_4Cl , Thioglycol und jeweils eine der folgenden Reagentien: MgCl_2 , NaF, EDTA. Nach 15 min Vorinkubation setzten wir D,L- ^{14}C -Glutaminsäure zu und lösten die Synthetase-Reaktion durch ATP aus. Die enzymatische Glutaminbildung wurde nach 20 min durch Hitzeinaktivierung abgebrochen und die verschiedenen Ansätze auf der Hochspannungselektrophorese getrennt. An Hand eines zwischen den einzelnen Auf-

tragsstellen mitgelaufenen Gemisches von Glu und GluNH₂ orientierten wir uns über die Lage der Aminosäurebanden. Es empfiehlt sich nicht die Banden selbst sichtbar zu machen, da die bei der Inkubation verwandte Glutaminsäure einheitlich an allen C-Atomen radioaktiv markiert ist. Die Ninhydrinreaktion führt zu unterschiedlichen ¹⁴C-Verlusten, die das Ergebnis stark verfälschen können. Tabelle 9 zeigt die Mg⁺⁺-Abhängigkeit der Glutaminbildung aus D, L-¹⁴C-Glutaminsäure.

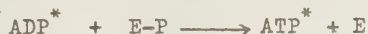
Obiger Ansatz	GluNH ₂ -Synthetase aus:					
	Erbse			Schafhirn		
	Glu Imp/min	GluNH ₂ Imp/min	$\frac{\text{GluNH}_2}{\text{Glu}+\text{GluNH}_2}$	Glu Imp/min	GluNH ₂ Imp/min	$\frac{\text{GluNH}_2}{\text{Glu}+\text{GluNH}_2}$
+ H ₂ O	24.300	273	1,11 %	23.360	620	2,58 %
+ Mg ⁺⁺	17.600	4.577	20,60	16.676	9.450	36,20
+ NaF	26.300	304	1,14	27.400	660	2,35
+ EDTA	25.200	290	1,14	25.500	470	1,8
-Enzym	18.300	203	1,10			

Tab. 9

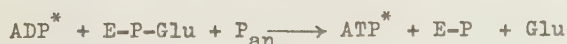
b) ADP^{*}/ ATP-Austausch

Der Einbau von ADP^{*} in ATP sollte bei Zutreffen der W i e l a n d 'schen Theorie aus 2 Reaktionsstufen möglich sein, nämlich:

a. durch Umkehrung der Zündreaktion:



b. durch Umkehrung der Aktivierungs- und Austauschreaktion:



Demnach müßte bei Inkubation von Enzym mit ADP^* und ATP eine bestimmte Menge ATP^* gebildet werden. Die Einbaurate sollte bei Phosphatzusatz zum Ansatz vergrößert werden, da dann E-P in Umkehrung der Austauschreaktion in höherer stationärer Konzentration vorliegen würde. Eine weitere Steigerung der Einbaugeschwindigkeit sollte schließlich durch Glutaminsäure zu erreichen sein. Zur Prüfung dieser Vorstellung inkubierten wir die Ansätze der Tab. 10 je 20 min bei 25°C , denaturierten das Enzym durch Erhitzen und trennten die Adeninnucleotide durch Hochspannungselektrophorese bei pH 4,2. Die Banden wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität bestimmt.

<u>Ansatz</u>		ADP Imp/min	ATP Imp/min	$\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$
50 EE Enzym	}			
+0,2 μM ADP				
+0,2 μM ATP		4.482	8.790	1,96
"	+1,3 μM P_{an}	2.986	4.926	1,65
"	+1,3 μM P_{an} + 2 μM L-Glu	3.158	8.183	2,58

Tab. 10

Entgegen der Erwartung nahm also die Einbaugeschwindigkeit des ADP / ATP-Austausches bei Phosphatzusatz ab. Vielleicht erfolgt der ADP-Einbau nur in enzymgebundenes ATP, analog der Glutamataktivierungsreaktion:



oder es beruht auf einer Verunreinigung unseres Präparates durch Myokinase.

c) P_{an}^* / ATP-Austausch.

Ein Einbau von isotop markiertem, anorganischem Phosphat in ATP sollte nach der zu beweisenden Theorie nur auf einer Stufe der Gesamtreaktion möglich sein, nämlich durch Umkehrung der Austausch- und Zündreaktion.



Es wurde eine große Zahl von Versuchen angestellt, um einen derartigen Phosphateinbau nachzuweisen. Wir inkubierten die Glutaminsynthetase mit radioaktivem Orthophosphat und ATP, mit und ohne Magnesium, auch unter Zusatz wechselnder Mengen von ADP und AMP, konnten aber in keinem Fall über 30% Austausch im elektrophoretisch abgetrennten ATP erzielen, wie Tab. 11 zeigt.

A n s a t z:	Vers. No.	Imp/2 min		P_{an}
		ADP	ATP	
50 EE+0,2µMol ATP+0,2µMol P_{an} = A	3/5	140	146	5.300
A + EDTA	5/5	300	51	5.000
A + Mg^{++}	1/5	16	72	12.000
A + Mg^{++} + 0,01 µMol ADP	1/4	19	25	12.000
A + Mg^{++} + 0,10 µMol ADP	1/3	66	48	12.000
A + Mg^{++} + 10,0 µMol ADP	1/1	105	65	12.000
A + Mg^{++} + " + 10µMol D-Glu	2/1	84	58	11.000

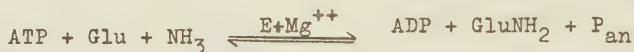
Tab. 11

Auch Inkubationsansätze in Gegenwart von D-Glutaminsäure ergaben keine höheren Einbauraten, obwohl diese nach MEISTER (49) ebenso schnell enzymatisch "aktiviert" wird,

wie das natürliche L-Isomere. Demnach trägt die Aktivierungsreaktion:



ebensowenig zum Phosphateinbau in ATP bei, wie die Zünd- und die Austauschreaktion. Ein guter Austausch findet erst bei Anwesenheit aller zur Glutaminsynthese nötigen Komponenten statt, wenn also die Bruttoreaktion möglich ist:



VI. Versuche an Sephadex - Säulen

a) Fehlerquellen bei der Sephadexfiltration.

Die Brauchbarkeit von Sephadex- Säulen zur Trennung niedermolekularer Substanzen von großen Molekülen ist mittlerweile hundertfach erprobt. Trotzdem sei hier gleich einleitend auf eine Möglichkeit von Blindwerten hingewiesen, gerade weil wir sie für unwahrscheinlich hielten und zunächst übersahen. Bei unendlich langsamer Durchlaufgeschwindigkeit der Lösung durch das Gel ist die Trennwirkung absolut, niedermolekulare Substanzen werden völlig zurückgehalten. Anders bei endlicher Tropfgeschwindigkeit und gar erst bei schneller. Wir erhielten mit unseren Säulen (Durchmesser 1,1 cm, Füllhöhe 15-18 cm), bei einem aufgetragenen Lösungsvolumen von 0,2-0,6 ml und einer Tropfgeschwindigkeit von 10-36 Tropfen/min = 0,3-0,9 ml/min auch beim Auftragen reiner Substanzen wie ^{32}P -ATP, ^{32}P -Phosphat oder ^{14}C -Glutamat regelmäßig 3 Reaktionsgipfel. Abb. 11 zeigt ein überhöht gezeichnetes charakteristisches Bild.

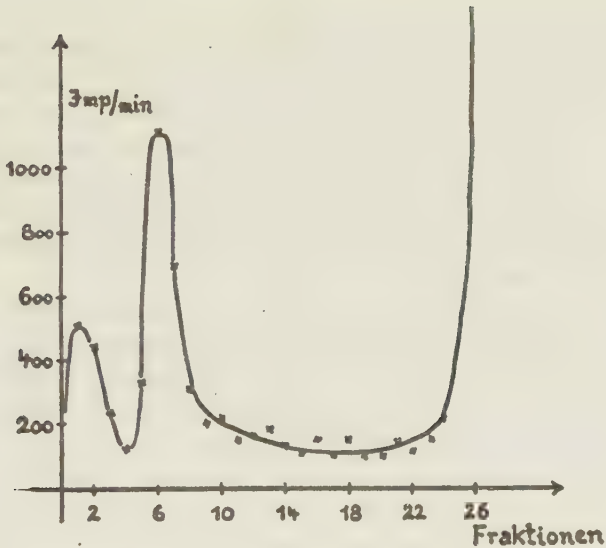


Abb. 11

Der erste Peak erscheint gleich in den ersten Fraktionen. Hier liegt auch bei der Filtration hochmolekularer Stoffe, z.B. von Enzymen immer ein kleines Maximum, dessen Höhe vom Durchmesser der Säule abhängt. Je breiter die Säule ist, je geringer also das Verhältnis von Umfang zur Fläche des Gelbettes, umso weniger der aufgetragenen Substanz wurde hier gefunden. Offenbar handelt es sich um einen Randeffect. Die Substanzen umgehen das Dextran entlang der Glaswand. Die 2. Bande hat ihr Maximum genau in den Fraktionen, wo auch die großen Moleküle, die nicht in die innere Phase des Dextrans eindringen können, in stärkster Konzentration auftreten. Ihr Anteil hängt in erster Linie von der Durchlaufgeschwindigkeit ab. Jede dieser 2 Banden kann bis zu 3% der gesamten niedermolekularen Komponente ausmachen, die im Idealfall einheitlich erst im 3. Peak vorkommen sollte. Für unsere Zwecke war der 2. Gipfel besonders störend, da er Fehler bis zu 80% verursachen konnte. Wir bemühten uns im folgenden stets seinen Anteil durch Ver-

langsamung der Tropfgeschwindigkeit unter 1% zu halten. Dagegen gelang es uns nicht, eine unspezifische Bindung bzw. Einschließung der Substrate durch Proteinmoleküle auszuschalten, z.B. fanden wir, daß Rinderserumalbumin bis etwa halb so viel ^{14}C -Glutaminsäure in die Proteinbande einschleuste, wie die Glutaminsynthetaselösung gleichen Eiweißgehaltes (+ATP). Eine genaue Bestimmung dieses Faktors war nicht möglich, weil das als Vergleichssubstanz verwendete Rinderserumalbumin andere physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist - und damit auch andere Adsorptionseffekte gegenüber niedermolekularen Verbindungen - wie unser Synthetaseprotein. Aus dem gleichen Grunde schied auch die Verwendung von denaturiertem Synthetaseprotein zur Ermittlung des Faktors einer unspezifischen Bindung von Substratmolekülen aus.

b) Vergiftung des Enzyms mit radioaktiv markiertem p-Chloromercuriphenylsulfonat.

Zur exakten Ermittlung der Wirkstellenäquivalente benutzten wir ^{35}S markiertes p-Chloromercuriphenylsulfonat (MPS). Dieses spezifische SH-Gruppenreagens verbindet sich mit den Sulfhydrylgruppen des Enzymproteins, so daß bei unseren Versuchen nach 30 Minuten Inkubation die Aktivität des Erbsen-enzym auf 4% ihres ursprünglichen Wertes abgesunken war. Für die Überprüfung, ob das Enzym selbst oder durch den Überschuß an MPS die Hilfsenzyme des Testgemisches gehemmt wurden, setzten wir der Testlösung unvergiftetes Enzym zu, das volle enzymatische Aktivität zeigte. Zur Abtrennung des überschüssigen radioaktiven Hemmstoffes vom Protein führten wir eine Filtration mit dem Dextrangel Sephadex G-50 (medium) durch. Das Eluat fraktionierten wir zu jeweils 10 Tropfen (0,25 ml), bestimmten in jeder Fraktion, nach Regeneration durch Cystein, die Enzymaktivität und zählten die Radioaktivität jeder Probe auf Aluminiumschälchen in einem endfensterlosen Methan - durchflußzählrohr.

Zur Gelfiltration trugen wir 0,5 ml der MPS-vergifteten Enzymlösung auf die Sephadex-Säule auf, diese entsprachen 360 EE. Im Eluat fanden wir insgesamt 305 EE, d.h. während der Filtration "verloren" wir nur etwa 14% der Enzymaktivität.- In der aktivsten Fraktion (No 9) hatten in 0,25 ml 100 EE $3,35 \cdot 10^6$ Imp/min an Radioaktivität gebunden. Da 0,57 μ Mol MPS $6,3 \cdot 10^6$ Imp/min entsprachen, erhalten wir: 0,01 μ Mol Wirkstellenäquivalente für 32 Enzymeinheiten.

Dieser Wert liegt, verglichen mit dem bei der optischen Bestimmung erhaltenen um etwa den 2-fachen Wert zu niedrig. Möglicherweise liegen nach diesem Befund je Wirkstelle 2 SH-Gruppen vor, so daß $2 \times 32 = 64$ Enzymeinheiten je 0,01 μ Mol Wirkstellenäquivalente abgeleitet werden können, oder aber es wird während der Filtration radioaktives Material von nichtessentiellen SH-Gruppen adsorptiv gebunden, wodurch eine zu hohe Zahl von Wirkstellenäquivalenten vorgetäuscht würde. Voraussetzung für diese Annahme ist, daß sich die Form der Proteinmoleküle nicht soweit verändert, daß sie beim Filtrationsvorgang vor oder nach der Hauptenzymfraktion eluiert werden. Es dürfte also keine Denaturierung unter ausgeprägter Änderung der Molekülform-und-größe, sondern eine Inaktivierung des Enzyms mit Veränderungen im aktiven Bereich des Proteinmoleküls vorliegen.

Bei einem weiteren Versuch mit MPS* vergifteten wir 0,3 ml der Enzymlösung, die 350 EE enthielt, mit dem radioaktiven SH-Reagens und trennten das Gemisch, nach Überprüfung auf Vollständigkeit der Hemmung, auf einer Sephadex G 50-Säule. Die einzelnen Fraktionen zu 0,3 ml prüften wir auf ihre enzymatische Aktivität. Zur Bestimmung der ersteren wurden die Proben mit 1 m Cystein-Lösung 2 min inkubiert und nach Reaktivierung getestet. Da 1 μ Mol MPS* $9,0 \cdot 10^6$ Imp/min zählte und die aktivste Fraktion (9) 63 EE/ml enthielt, entsprach dies wiederum einem Wert von 31 Enzymeinheiten für 0,01 μ Mol Wirkstellenäquivalente.

Abb. 12 zeigt das Fraktionierungsschema des zuvor beschriebenen Versuches:

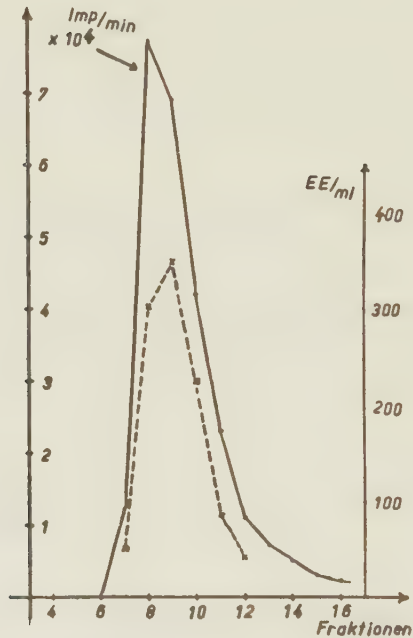


Abb. 12

Ähnliche Versuche führten wir zum Vergleich mit Glutaminsynthetasepräparaten aus Schafshirn durch. Bei gleicher MPS*-Konzentration ($10^{-4}M$) wird das Hirnenzym wesentlich weniger gehemmt (zu 57% innerhalb 30 min) als das aus Erbsen gewonnene (99,6% in 30 min). Das könnte durchaus auf dem Vorliegen von enzymgebundenen, schützendem ATP, bzw. Phosphat von der Gewinnung her beruhen. Das Hirnenzym erwies sich ferner als wesentlich labiler bei der Sephadex-Filtration. Im Eluat fanden wir nur ca. 10% der aufgetragenen Enzymaktivität gegenüber ca. 80% beim Erbsenenzym. Dagegen stimmten Enzympräparate beiderlei Ursprungs in ihrem spezifischen MPS-Bindevermögen

überein. Auch das Hirnenzym hielt auf eine Enzymaktivität von ca. 30 EE jeweils 0,01 μ Mol Hg-Reagens gebunden. Abb. 13 zeigt den Fraktionierungsversuch mit Schafshirnenzym.

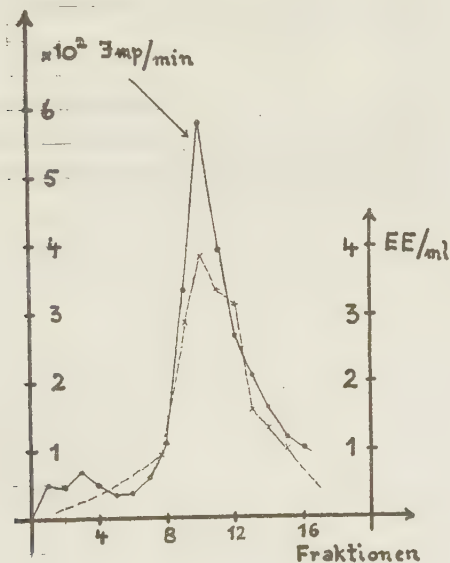


Abb. 13

c) Versuche mit isotop markiertem ATP.

Eine weitere Möglichkeit, die Anzahl der Wirkstellen im Enzym zu bestimmen, bietet seine Umsetzung mit radioaktivem ATP und Abtrennung des überschüssigen Adeninnucleotids. Die Isolierung eines Glutaminsynthetase-ATP-Komplexes gelang A. D a h l i n g e r durch Sephadex-Filtration. In Fortführung dieser Studien stellten wir eine Vielzahl prinzipiell ähnlicher Versuche an, mit dem Ziel, das ATP-Bindevermögen

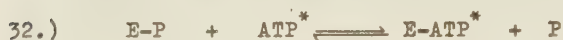
noch exakter zu erfassen. Wir inkubierten das Enzym mit ATP, das in α -, in γ -, oder in β , γ -Stellung mit radioaktivem Phosphat markiert war. Die Filtration über Sephadex G-50, medium (das sich auch hier am besten bewährte) ergab stets sehr ähnliche Bilder, wie wir sie bei den Inaktivierungsversuchen mit ^{35}S -Mercuriphenylsulfonat erhielten. (Siehe Abb. 11,12)

In den aufgefangenen Eluatfraktionen bestimmten wir die enzymatische und die Radioaktivität und setzten die Enzymeinheiten in Beziehung zum Isotopengehalt. Tabelle 12 zeigt eine Aufstellung der erhaltenen Werte:

Vers. Ansatz:								
No	a. ATP	μMol	Imp/ min/ μMol	b. Pan μMol	Frakt. No	EE/ ml	Imp/ min/ ml	EE/ 0,01 μMol
1	Erbsen- E. - γ - ³² P-ATP	1	$1,25 \cdot 10^7$	13,4	5	9,6	830	101
					6	100	3520	242
					7	146	4950	256
					8	105	4670	197
					9	73	3460	183
					10	48	2260	184
					11	22	1960	97
					12	10	1430	61
2	"	0,22	$1,2 \cdot 10^6$	26,8	G-5	331	340	116
					G-6	137	120	120
					G-7	51	108	57
3	"	2,6	$3,6 \cdot 10^8$	13,4	7	110	9930	685
					8	55	9370	354
					9	26	4600	278
					10	9	2330	135
4	" $1,22 \cdot 10^{-3}$ =Enzym-ATP* aus vorher- gehender ATP- Abtrennung	$1,4 \cdot 10^6$	-	-	6	0,4	166	166
					7	0,5	186	185
					8	4,8	667	500
					9	3,1	586	267
5	"	0,22	$1,4 \cdot 10^7$	13,4	6	25	2570	48
					7	116	4320	134
					8	88	3340	132
					9	26	2120	61
6	Erbsen- E.+ β - γ - ATP*	1,8	$5 \cdot 10^6$	-	I	176	2100	430
					II	59	130	88
7	"	1,8	$1,4 \cdot 10^5$	-	I	113	250	410
					II	16	118	50
8	Erbsen- E+ α -ATP Enzym mit MPS ver- giftet, nicht reak- tiviert.	0,15	$1,5 \cdot 10^8$	13,4	3	3	535	84
					4	6,2	490	190
					5	17,5	2600	130
					6	60,0	5600	156
					7	35,0	4900	106
					8	16,5	4800	51
9	" Enzym mit MPS ver- giftet, re- aktiviert.	0,15	$6 \cdot 10^7$	13,4	4	6,1	468	87
					5	64,7	3110	138
					6	52,3	2116	163
					7	25,6	836	201
					8	9,2	796	76

Tab. 12

Tab. 12 zeigt eine befriedigende Übereinstimmung der Verhältnismerte in den einzelnen Versuchen. Diese Identität ergibt sich nur nach Berücksichtigung des Phosphatgehaltes der Ansätze unter der Annahme, daß die Gleichgewichtskonstante der Austauschreaktion:



bei 1 liegt. Der Mittelwert erscheint auch weitgehend unabhängig von der Konzentration und der Radioaktivität des eingesetzten ATP.

Auffallend ist der in allen Versuchen auftretende Gang n_a nach dem die enzymreichen Mittelfractionen verhältnismäßig weniger Markierung aufweisen, als die davor und danach aufgefundenen, die weniger Eiweiß enthielten. Der Radioaktivitäts-Peak scheint flacher ausgeprägt zu sein als der Enzymgipfel. Als Erklärung für diese scheinbar zu geringe Radioaktivität bietet sich die Selbstabsorption der Strahlung durch die größere Proteinmenge an.

Falls die Austauschreaktion mit genügender Geschwindigkeit abläuft, sollten eventuell von der Aufarbeitung her an das Enzym gebundene Phosphat- oder ATP-Reste den Einbau des markierten ATP nicht beeinflussen, im Gegensatz zur Zündreaktion, die ausbleiben bzw. geschwächt werden müßte. Zur Überprüfung vergifteten wir das Enzym mit nichtradioaktivem Merguriphenylsulfonat zur völligen Inaktivierung, wodurch auch Thiolphosphatbindungen gespalten werden sollten. Das Enzym wurde mit Cystein reaktiviert, mit α - ^{32}P -ATP inkubiert und die Enzym-ATP-Verbindung isoliert. Das gefundene Verhältnis von Enzym zu Radioaktivität (Vers. 9 Tab. 12) entsprach innerhalb der Fehlergrenze den Werten, die wir mit nicht vorbehandeltem Enzym erhielten (Vers. 1, Tab. 12). Gleiche Verhältniszahlen fanden wir aber auch, wenn das Enzym vor der Inkubation mit ATP nicht reaktiviert wurde, sondern erst im Testansatz nach der Sephadex-Filtration (Vers. B, Tab. 12).

Das würde bedeuten, daß auch die vergiftete Synthetase ATP zu binden vermag. Jedoch ist hierbei das Vorliegen einer Verdrängungsreaktion nicht ganz auszuschließen.

Im Versuch 4 Tab. 12 wurden die enzymreichsten Fraktionen aus Versuch 3 über eine Sephadex-Säule (G-50 med.) chromatographiert. Das Aktivitätenverhältnis stieg hierbei nur geringfügig auf ca. 250 EE/0,01 μ Mol an, woraus auf eine ziemlich feste Bindung des ATP geschlossen werden darf.

d) Versuche mit radioaktivem Phosphat.

Bei Zutreffen der Annahme eines freien Phosphat/ATP-Austausches am Enzym sollte auch ^{32}P -Phosphat gebunden werden, wenn es mit Glutaminsynthetase und ATP inkubiert wird. Nach Abtrennung des überschüssigen Phosphats durch die Sephadex-Säule sollten ähnliche Verhältniszahlen zwischen Enzym- und Radioaktivität resultieren, wie in den Versuchen mit ^{32}P -ATP. Wie Tab. 13 zeigt, liegen sie in der gleichen Größenordnung wie dort.

Ansatz: 1.) Erbsenenzym
2.) " "
3.) Schafhirnenzym

	P _{an} (μMol)	Imp/min/ μMol	ATP (μMol)	Frakt.	EE/ ml.	Imp-1 min-1 ml-1	EE/ 0,01 μM.
1.)	15,85	2,36.10 ⁶	2,5	5	8,5	2.450	48
				6	180	5.600	430
				7	261	6.005	590
				8	120	3.000	550
				9	52	2.160	327
				10	13	1.980	90
				11	7	1.350	71
2.	7,0	3,6.10 ⁶	0,2	4	1,5	500	107
				5	7	1.400	180
				6	20	1.390	510
				7	20	990	710
				8	9	690	470
				9	5	680	260
				10	3	1.450	75
3.)	2,5	1,0.10 ⁷	2,5	4	64	3.290	985
				5	120	15.960	375
				6	55	2.420	1.135
				7	22	1.570	700
				8	6,5	1.020	320

Tab. 13

Als Mittelwert ergibt sich für das Erbsenenzym, daß auf ca. 300 Enzymeinheiten 0,01 μMol Phosphat gebunden wurde, von Glutaminsynthetase aus Schafshirn dagegen ca. 700.

e) Versuche mit ¹⁴C-Glutamat

In den früheren Arbeiten (41,42) wurde die aktivierte Glutaminsäure als enzymgebundenes Glutamylphosphat erkannt und durch Sephadex-Chromatographie isoliert. Wir versuchten ihre Reindarstellung auf dieselbe Weise durch Inkubation isotop markierter Glutaminsäure (D,L und L-¹⁴C-Glutaminsäure von Radiochemical Centre, Amersham) mit Enzym und ATP bei

pH 5,5 und Abtrennung des überschüssigen Glutamats mittels der Sephadex-Säule. Die Filtration lieferte das gleiche Bild wie bei den ATP- und den Phosphatversuchen:

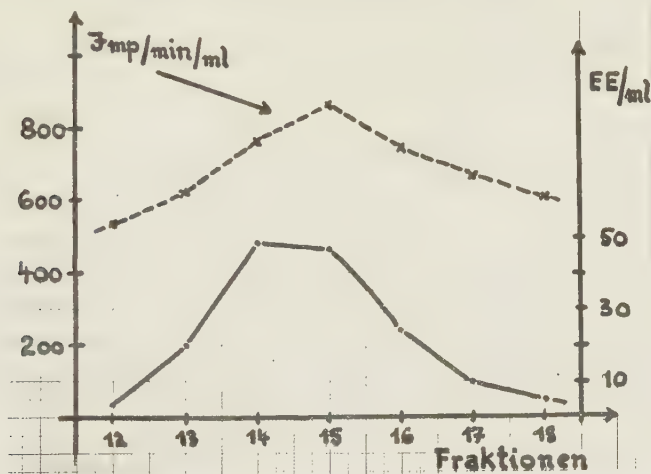


Abb. 14

Wegen der schwächeren Strahlung der ^{14}C -Verbindungen und der stärkeren Selbstabsorption der Proben erhielten wir wesentlich stärkere Schwankungen in den Relationen zwischen Enzym- und Radioaktivität. Zur Bindung von 0,01 μ Mol Glutamat isolierte Enzym-Glutamat-Komplex lieferte bei Inkubation mit Ammoniak zwischen 40 - 80% Glutamin. Bei Inkubation mit ADP wurden bis zu 95% der Radioaktivität nach Elektrophorese in der Glutaminsäurebande gefunden.

C. Diskussion

Ein wesentlich tieferes Eindringen in den Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase gelang uns leider nicht. Im Gegenteil bedeutet die vorliegende Arbeit eher einen Rückschritt gegenüber den von A. DAHLINGER (42) erhobenen

Befunden, deren Studien fortgeführt werden sollten. Der Stand unserer Kenntnisse sei aufgezeigt an Hand der Aufgliederung der Gesamtreaktion nach Th. WIELAND u.a.(40) in Einzelschritte.

Die Zündreaktion:



wurde auch von uns durch enzymatisch-optische Bestimmung des freigesetzten ADP gemessen. Wir fanden, daß im Mittel von je 8.200 Einheiten Glutaminsynthetase 1 μ Mol ATP gespalten wird. Dieser Wert entspricht den 5.300 Enzymeinheiten, die A. D a h l i n g e r fand, da wir den Enzymtest bei höherer Temperatur durchführten.

Bei einer spezifischen Enzymaktivität von 230 Einheiten/mg, die unser reinstes Synthetasepräparat aufwies, ergäbe sich ein Äquivalenzgewicht von 36.000 g Protein pro Wirkstelle. L.LEVINTOW und A.MEISTER u.a.(50) bestimmten das Molekulargewicht der Glutaminsynthetase aus Erbsen zu 420.000. Das Enzymmolekül würde demnach 12 Wirkstellen enthalten. A.MEISTER (51) gibt ferner an, daß das nach Elliott gereinigte Erbsenenzym, das wir verwendeten, maximal 50%ig sei. Dadurch würde sich das Äquivalenzgewicht auf 18.000 erniedrigen, die Anzahl der aktiven Zentren auf 24 erhöhen.

Für die Umkehrbarkeit der Zündreaktion spricht der rasche Isotopenaustausch zwischen ADP^* und ATP, der mit Enzym allein ohne Glutaminsäurezusatz eintritt. Gegen die Umkehrbarkeit der Zündreaktion spricht der äußerst geringfügige Einbau von ^{32}P -Phosphat in ATP, der über eine Umkehrung der Austauschreaktion



mit gleicher Geschwindigkeit wie der ADP/ATP-Austausch ab-

laufen sollte, wenn letzterer nicht am Enzym nach:



reagiert oder einfach auf einer Myokinase-Reaktion des Präparates beruht.

Die Austauschreaktion: $\text{E-P} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{E-ATP} + \text{P}_{\text{an}}$ bewirkt zusammen mit der Zündreaktion die Bindung von isotopt markiertem ATP und ^{32}P -Phosphat an das Enzym, das derart beladen durch Sephadex-Filtration isoliert wurde. Die Beladungsversuche ergaben, daß im Mittel 1 μMol ATP von einer Glutaminsynthetasemenge von 18.000 Einheiten gebunden wird, 1 μMol Phosphat von etwa 30.000. Daraus errechnet sich ein Äquivalenzgewicht von 78.000 bzw. 130.000 g. Protein/Mol Wirkstelle (bei spezifischer Aktivität 230 EE/mg) und einer Anzahl von 5-6 bzw. 3-4 Wirkstellen/420.000 g Protein.

Größere Schwankungen brachte das Studium der Aktivierungsreaktion: $\text{E-ATP} + \text{Glu} \rightleftharpoons \text{E-P-Glu} + \text{ADP}$, da die schwache Strahlung der ^{14}C -Glutaminsäure, die nach Inkubation mit dem Enzym und ATP als enzymgebundene "aktivierte Glutaminsäure" durch Sephadex-Filtration isoliert wurde, durch das Protein stark absorbiert wird. Zur Bindung von 1 Mol Glutaminsäure brauchten wir minimal 15.000 Einheiten Synthetase (im Mittel ca. 100.000). Die "aktivierte Glutaminsäure" liefert bei Reaktion mit Ammoniak bis zu 80% an Glutamin. Durch ADP ließ sie sich zu 95% als gewöhnliche Glutaminsäure freisetzen. Die enzymatisch-optische Bestimmung des ADP, das in der Aktivierungsreaktion erneut freigesetzt wird, ergab Werte zwischen 8.000 und 70.000 Enzymeinheiten pro μMol .

Für die enzymatische Katalyse durch Glutaminsynthetase spielen Thiolgruppen eine wichtige Rolle. Das Enzym wird durch quecksilberorganische Verbindungen wie p-Mercuriphenyl-

sulfonat (MPS) vollständig und reversibel gehemmt. Wir fanden, daß $1 \mu\text{Mol } ^{35}\text{S-MPS}$ auf 3.200 Enzymeinheiten gebunden wurde. Nach Th. WIELAND u.a. (40) würde in der Zündreaktion ein Enzymthiol-Phosphat (E-S-P) gebildet, das in der Austauschreaktion unter Phosphatfreisetzung ATP zu E-S-ATP wieder über einen Phosphatrest bindet. Diese unmittelbare Beteiligung der SH-Gruppen erscheint zweifelhaft, da auch das mercuri-vergiftete Enzym gleichviel ATP fest zu binden vermag, wie unvergiftetes. Eine der Zünd-oder Aktivierungsreaktion entsprechende ADP-Freisetzung konnten wir allerdings nur mit nativem oder cystein-reaktiviertem Enzym nachweisen.

Als Hauptargument gegen das Wieland'sche Reaktionsschema scheint die starke Steigerung (Faktor 10-100), die der Einbau von $^{32}\text{P-Phosphat}$ durch Zusatz von L-Glutaminsäure und Spuren von Ammoniak erfährt. Nach dieser Theorie sollte Phosphatfreisetzung und umgekehrt auch -bindung nur auf der Stufe der Austauschreaktion erfolgen, also unabhängig vom Glutamat sein. Der Phosphateinbau wird nicht gesteigert durch D-Glutamat, das nach Befunden des Arbeitskreises um A. M e i s t e r ebenso schnell aktiviert wird, wie L-Glutamat, aber nur sehr langsam zu Glutamin weiterreagiert (wesentlich schneller zu Pyrrolidincarboxylat, wobei ebenfalls Phosphat und ADP frei werden). Danach scheint erst auf der Stufe der Synthesereaktion:



eine wesentliche Aufnahme von Phosphat vom Enzym einzutreten. Auch die erwähnte Phosphathemmung der Enzymreaktion wird also möglicherweise erst hier verursacht. Dieser Befund ließ sich am besten durch die Annahme einer "concerted reaction" nach BUCHANAN (39) deuten, in der die Bildung der Amidbindung gleichzeitig mit der ATP-Spaltung vorgehen würde, ohne vorheriges Auftreten irgendeiner kovalenten Bindung, also auch ausdrücklich ohne Zündreaktion.- Dagegen glauben wir das Vorliegen einer Zündreaktion mehr als wahrscheinlich gemacht zu haben. Sie findet sich auch in Arbeiten von ELLIOTT (34 Fig. 2), der seine Enzympräparate an der Phosphatfreisetzung

bestimmte und dabei offenbar auch ohne Glutamat stets eine bestimmte Menge an Phosphat fand. Diese ATP-Spaltung kann nicht durch eine ATPase verursacht worden sein, da die Phosphatmenge zwischen 10 und 60 min Inkubationszeit konstant blieb. Der Phosphatanstieg zwischen 0 und 10 min erinnert an unsere ADP-Bestimmungskurve. A. M e i s t e r verneint noch in seiner letzten Publikation das Auftreten einer Zündreaktion ebenso energisch, wie er früher die Bindung von ATP an das Enzym in Abwesenheit von Glutamat bestritt. Von eben dieser Bindung macht er jetzt zum Schutz des Enzyms gegen Hitzedenaturierung Gebrauch. Von diesem Schritt her scheint sein Enzym aus Schafhirn (über Zünd- und Austauschreaktionen) in der Endreinigung relativ viel ATP (und P_{an}') gebunden zu halten, wie er aus der UV-Extinktion bei 260 m μ schloß. So ließ sich an Glutaminsynthetase, die wir nach seiner Vorschrift darstellten, eine Zündreaktion enzymatisch-optisch kaum nachweisen. Auch war bei sonst sehr ähnlichem Verhalten die Beladbarkeit dieses Präparates mit ^{32}P -Phosphat nur halb so hoch, wie die des Erbsenenzym, das während der Reinigung nicht mit ATP in Berührung kommt. Trotz seiner Verneinung läßt sich auch aus den Versuchen von M e i s t e r eine Zündreaktion deutlich erkennen: 81.000 Einheiten (bzw. 90.000 Einheiten definiert nach M e i s t e r) setzten bei Inkubation mit ATP (und Mg^{++}) 1 μ Mol ADP frei. Ein weiteres μ Mol ADP wird nach Glutamatzugabe von 18.700 Synthetase-Einheiten freigesetzt. M e i s t e r fand auch eine Bindung von ^{14}C -Glutaminsäure (in Gegenwart von ATP) an das Enzym. Den Enzym-Glutamat-Komplex reicherte er durch Ultrafiltration oder mittels Ultrazentrifuge an. Bei $1/40$ der Michaelis-Konzentration (K_m) an Glutamat wurde 1 μ Mol pro 36.000 Enzymeinheiten (bzw. 39.200 EE nach M e i s t e r) gebunden, bei $1/10 K_m$ pro 16.500 Einheiten (17.900 EE nach M e i s t e r). Bei Sättigung mit Glutamat könnte ein Wert von ca. 1 μ Mol/10.000 Enzymeinheiten erreicht werden. Ähnliche Werte erhielt er aus der Hydrolyse der Enzym- β, γ - ^{32}P -ATP-Glutaminsäure-Verbindung (22.000 EE $\approx$ 1 μ Mol) und aus der Bindung von ^{14}C -Glutamin (+ADP) an das Enzym (18.000 EE $\approx$ 1 μ Mol).

M e i s t e r verwendete ein Schafhirn-Enzym von unge-
rechnet 135 Einheiten/mg (bzw. nach seinem Hydroxamsäretest
150 Einheiten/mg). Das Protein war einheitlich in der Ultra-
zentrifuge mit einem Molekulargewicht von 450.000. Aus den
eben beschriebenen Versuchen errechnet sich ein Äquivalent-
gewicht von 75.000 bis 270.000 g pro Mol Wirkstelle und das
Vorliegen von 1,6 bis 6 aktiven Zentren pro Enzymmolekül.
Unser besten Erbsenenzym hatte fast die doppelte spezifische
Aktivität von 230 Einheiten/mg. Die von uns gefundenen Werte
36.000 bis 300.000 g Protein pro Mol Wirkstelle mit einem
Mittelwert von 6 aktiven Zentren pro Enzymmolekül liegen in
derselben Größenordnung wie die des Arbeitskreises um
A. M e i s t e r. Auch scheint es plausibel, daß die doppelte
spezifische Aktivität des Erbsenenzyms gegenüber dem Schaf-
hirnpräparat auf einer doppelt so großen Zahl von Wirkstellen
pro Enzymmolekül beruhen könnte.

D. Zusammenfassung

- 1.) Es wurden Verfahren erarbeitet, die es gestatteten, die
Adeninnucleotide AMP, ADP und ATP auf bequeme, enzymatische
Weise in jeder gewünschten Position, also in α , β oder γ -
Stellung oder auch in mehreren gemeinsam mit hoher spezifischer
Radioaktivität und in guter Ausbeute mit ^{32}P -Orthophosphat zu
markieren.
- 2.) p-Mercuriphenylsulfonat wurde aus ^{35}S -Sulfanilsäure durch
ein neuartiges Verfahren der Mercurierung des Diazoniumsalzes
mit metallischem Quecksilber dargestellt. Es erwies sich als
potentes Mittel zum Studium enzymgebundener SH-Gruppen.
- 3.) Der enzymatisch-optische Test auf Glutaminsynthetase
wurde auf Temperatur- und pH-Konstanz standardisiert.

4.) Eine Reihe von Methoden wurde für die weitere Reinigung der Glutaminsynthetase erprobt. Die spezifische Aktivität unseres reinsten Präparates stieg damit von bisher 183 auf 230; die Anreicherung von bisher 322-fach auf das 405-fache. Zum Vergleich wurde das Enzym aus Schafhirn nach M e i s t e r u.a. dargestellt.

5.) Die "Zündreaktion" : $E + ATP \longrightarrow E-P + ADP$ nach Th. W i e l a n d u.a. wurde wahrscheinlicher gemacht durch viele Bestimmungen des gebildeten ADP. Unsere reinsten Präparate ergaben im Mittel ein μMol -Äquivalent von 8.200 Enzym-einheiten.

6.) Die "Austauschreaktion" : $E-P + ATP \rightleftharpoons E-ATP + P_{an}$ bewirkt zusammen mit der Zündreaktion die Bindung von ^{32}P -markiertem ATP und Phosphat an die Glutaminsynthetase. Das beladene Enzym wurde durch Sephadex-Filtration isoliert. Das μMol -Äquivalent betrug 18.000 bis 30.000 Einheiten.

7.) Durch die "Aktivierungsreaktion": $E-ATP + \text{Glu} \rightleftharpoons E-P\text{-Glu} + ADP$ wird auch ^{14}C -Glutaminsäure vom Enzym gebunden. Wir fanden das μMol -Äquivalent zu minimal 15.000.

8.) Das bei der Aktivierungsreaktion freiwerdende ADP wurde enzymatisch-optisch zu 1 μMol pro 8.000 bis 70.000 Enzymeinheiten bestimmt.

9.) Aus diesen Werten errechnet sich ein Äquivalentgewicht von 36.000 bis 300.000 g Protein je Wirkstelle. Dies ergibt einen Mittelwert von 6 aktiven Zentren pro Enzymmolekül (spezif. Aktivität 230 Einheiten/mg, Molekulargewicht 420.000). Auf dieselbe Größenordnung deuten Befunde von A. M e i s t e r .

10.) Auf 3.200 Enzymeinheiten wird 1 μMol Mercuriphenylsulfonat gebunden. Das MPS-inaktivierte Enzym bindet ebensoviel ^{32}P -ATP, wie das native oder cystein-reaktivierte, es ließ aber keine Zündreaktion erkennen, wobei eine Verdrängungsreaktion nicht ausgeschlossen werden konnte.

11.) Die katalytische Reaktion wird durch Orthophosphat kompetitiv gehemmt. Nach der Theorie von W i e l a n d u.a. ist eine solche Hemmung nur auf der Stufe der Austauschreaktion zu erwarten.

12.) Der ^{32}P -Phosphat/ATP-Austausch wird durch L-Glutamat + wenig Ammoniak gesteigert. Das spricht für eine Aufnahme von Phosphat an das Enzym in der "Synthesereaktion":
 $\text{E-P-Glu} + \text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{E-P} + \text{GluNH}_2$, während sie nach der Theorie von Th. W i e l a n d u.a. nur in der Austauschreaktion möglich sein sollte, also unabhängig von Glutamat.

Experimenteller Teil

1. Isolierung der Glutaminsynthetase aus Erbsen nach (26)

a) Extraktion

Grüne Schalerbsen, "Vorbote" No 1740-3, von der Firma Garvens, Hannover, wurden staubfein gemahlen. 2,35 kg dieses Erbsenmehls extrahierten wir 30 min mit 18,8 Liter 0,1m NaHCO_3 -Lösung unter ständigem Rühren. Alle folgenden Arbeitsgänge werden bei 0° - 1°C im Kühlraum durchgeführt. Der Überstand wird am nächsten Tage dekantiert, der Niederschlag in der Stock-Zentrifuge bei 3000U/min zentrifugiert und beide Überstände vereinigt.

Volumen: 17,5 Liter

Protein: 14,5 mg/ml

b) Ammoniumsulfat-Fällung

Obiger Extrakt wird mit etwa 300ml 2m KH_2PO_4 -Lösung am pH-Meter auf pH 6,5 genau eingestellt und anschließend mit 5,250 kg Ammoniumsulfat (Merck, puriss.) innerhalb von etwa 6 h unter Rühren versetzt. Der Niederschlag bleibt über Nacht stehen. Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag nach dem Zentrifugieren in 560ml bidest. Wasser aufgenommen und mit 2m K_2HPO_4 auf pH 7,2 eingestellt und anschließend 48 h gegen 2x20 Liter dest. Wasser dialysiert.

Endvolumen nach der Dialyse: 1500ml

Protein : 31mg/ml

Enzymeinheiten (EE) : 20 EE/ml

Spezifische Aktivität (Sp.A) : 0,65

c) Protaminsulfat-Fällung

Das trübe Dialysat wird mit etwa 400ml einer 2% Protaminsulfat-Lösung solange versetzt, bis kein Niederschlag mehr zu

beobachten ist. Nach der Abtrennung des Niederschlages durch Zentrifugation, wird der Überstand weiterverarbeitet.

Volumen	:	2,1 Liter
Protein	:	20 mg/ml
Enzymeinheiten	:	16 EE/ml
Spezifische Aktivität	:	0,80

d) Nucleinsäure-Fällung

Dieser Reinigungsschritt erfordert die größte Sorgfalt, da ansonsten starke Aktivitätsverluste zu erwarten sind. 2,1 Liter des Überstandes von c wurden mit etwa 50-70 ml 1n Essigsäure auf genau pH 5,1 (mit pH-Meter!) unter ständigem Rühren eingestellt und sofort danach mit insgesamt etwa 150-180ml einer 2% K-Nucleatlösung (Merck, Hefenucleinsäure mit KOH auf pH 5,4 eingestellt) versetzt. Da das aktive Protein ausgefällt wird, läßt sich die im Überstand verbliebene Enzymaktivität durch Zwischenteste leicht bestimmen. Die Fällung bleibt 11/2 h stehen, wird zentrifugiert und der Niederschlag mit 60ml bidest. Wasser aufgenommen, suspendiert und mit 1m K_2HPO_4 auf pH 7,3 eingestellt. Nach 15 min Extraktion wird die Suspension zentrifugiert, der Niederschlag nochmals mit $H_2O + K_2HPO_4$ gewaschen und nach Zentrifugation beide Überstände vereinigt.

Volumen	:	120 ml
Protein	:	24,7 mg/ml
Enzymeinheiten (EE)	:	141 EE/ml
Spezif.Aktivität	:	5,7

e) Ammoniumsulfat-Fällung

120 ml Enzymlösung werden mit 1m Phosphat-Puffer, pH 7,3 versetzt und anschließend mit 78ml gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (0°C) gefällt. Nach 15 min trennt man den inaktiven Proteinniederschlag durch Zentrifugation ab und fällt das aktive Enzymprotein aus dem Überstand mit 75 ml gesättigter

Ammoniumsulfat-Lösung. Dieser Niederschlag wird nach 1 stündigem Stehen zentrifugiert und in 15 ml m/10 Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 aufgenommen. Die Enzymlösung kann nunmehr ohne großen Aktivitätsverlust bei -15°C aufbewahrt werden.

Volumen : 15ml
 Protein : 26,7 mg/ml
 Enzymeinheiten (EE) : 895 EE/ml
 Spezif.Aktivität : 33,5

f) Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Durch weitere Fraktionierung durch Ammoniumsulfat gelang uns das Enzym bei einer Ammoniumsulfat-Molarität von 1,65-1,85 (entspr. einer Am. sulf.sättigung von 0,42-0,48) bis zu einer spezifischen Aktivität von 170-230 zu reinigen.

Ein Beispiel einer Enzymreinigung durch Ammoniumsulfat-fraktionierung sei hier näher aufgeführt:

	Gesamt- volumen	Protein mg/ml	Akti- vität EE/ml	Gesamt- aktivi- tät	Spezi- fische Aktivität
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	17,2ml	13,5	815	14.000	60
3. "	7,5 "	11,5	1847	13.850	160
4. "	6,0 "	9,2	2131	12.786	232

Versuche zur Hitzeinaktivierung von Erbsenenzym:

	A.) +ATP	B.) -ATP
<u>Ansätze:</u>	0,5 ml Enzym=390 EE/ml	0,5 ml Enzym
	0,1 " m/2 Mg^{++}	0,1 " m/2 Mg^{++}
	0,5 " m/10 ATP	0,5 " m/10 Tris-P

jeweils 10 min erhitzt auf:

1. 30°C	370 EE/ml	350 EE/ml
2. 40°C	352 EE/ml	302 EE/ml
3. 45°C	302 EE/ml	96 EE/ml
4. 50°C	175 EE/ml	0 EE/ml
5. 55°C	2 EE/ml	0 EE/ml

Die Zeitabhängigkeit der Hitzeinaktivierung bei 45°C:

A.) +ATP

B.) -ATP

Ansätze: 0,3 ml Enzym= 245 EE/ml
 0,1 " m/2 Mg⁺⁺
 0,5 " m/10 ATP
 0,2 " m/10 Tris-P.

0,3 ml Enzym
 0,1 " m/2 Mg⁺⁺
 0,7 " m/10 Tris-P.

Enzymaktivitäten bei 45°C nach jeweils:

1. 10 min	:	233 EE/ml	70 EE/ml
2. 15 "	:	224 "	37 "
3. 20 "	:	200 "	10 "
4. 25 "	:	122 "	0 "

2. Isolierung der Glutaminsynthetase aus Schafhirn nach (43)

a) Darstellung des Acetontrockenpulvers aus Schafhirn

Frisches Schafhirn wird von den Bindegeweben gesäubert und anschließend in einem Mixgerät bei 0°C 30 sec homogenisiert. Das Homogenat versetzt man mit Aceton (2 Liter Aceton je kg. Hirn), das auf -15°C vorgekühlt wurde und rührt 5 min bis keine Klumpen mehr vorhanden sind. Darauf filtriert man durch einen großen Buchner-Trichter Ø 32 cm und wäscht den Rückstand 3x mit Aceton (insgesamt 3 Liter Aceton je kg. Hirn). Es wird bis zur Trockne abgesaugt und bei Zimmertemperatur trocknen gelassen. Das Trockenpulver wird bei -15°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. 2,4 kg frisches Schafhirn ergeben 370-400 g Trockenpulver.

b) Extraktion

400 g Acetonpulver werden mit 8 Liter 0,15m KCl-Lösung, die 0,005m an Mercaptoäthanol ist, bei 26°C 10 min gerührt, zentrifugiert (15 min in einer Phywe-Kühlzentrifuge), der Überstand durch eine dünne Lage Glaswolle filtriert und sofort weiterverarbeitet. Alle folgenden Reinigungsschritte

werden bei 0°C in der Kühlzelle durchgeführt.

c) pH 4,2-Fällung

Obige Lösung wird auf 0°C abgekühlt und in Fraktionen zu 1500 ml aufgeteilt. Jede Fraktion bringt man mit 1n Essigsäure unter ständigem Rühren im Zeitraum von 20 min auf genau pH 4,2. Das ausgefallene Protein wird sofort durch Zentrifugieren vom Überstand getrennt, der kein aktives Material enthält und daher verworfen werden kann. Die Niederschläge der einzelnen Fraktionen werden vereinigt und 2x mit bidest. Wasser gewaschen, das 0,005m an Mercaptoäthanol ist (1. Waschung mit 1 Liter, die 2. mit 0,5 Liter).

d) Extraktion bei pH 6,8

Den gewaschenen Niederschlag suspendiert man in 200 ml 0,15m KCl-Lösung + 0,005m Mercaptoäthanol und bringt die Suspension vorsichtig mit 0,1n NaOH auf pH 6,8. Zur vollständigen Extraktion wird 30 min gerührt und anschließend mindestens 30 min bei 15.000xg zentrifugiert. Den Niederschlag extrahiert man auf die gleiche Weise nochmals und vereinigt die Überstände.

e) Hitzeinaktivierung

Die Extrakte werden mit 45 ml 0,5 m Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,2 versetzt, der 0,5m an MgCl_2 ist, außerdem mit 20 ml einer wässrigen Lösung von 2,72 g ATP, pH 7,0. Die Endkonzentration obiger Reagentien soll folgende Werte betragen: Imidazol 0,05 m, ATP 0,01 m, Mg^{++} 0,05 m. Die Lösung füllt man in ein etwa 800 ml fassendes Becherglas und stellt dieses in ein Wasserbad von 80°C . Unter ständigem Rühren läßt man die Temperatur im Becherglas bis auf 58°C steigen, hält diese Temperatur 6 min und kühlt die inzwischen milchigtrüb gewordene Lösung auf $1-2^{\circ}\text{C}$ ab und zentrifugiert.

f) Fraktionierung durch pH-Einstellung

Den Überstand vom letzten Reinigungsschritt bringt man mit 1n Essigsäure auf pH 4,8. Die Lösung wird zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. Den Überstand stellt man auf pH 4,2 mit 1n Essigsäure ein, läßt 30 min Rühren und zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit 0,005 m Mercapto-äthanol gewaschen und anschließend in m/10-Tris-Puffer gelöst.

g) Ammoniumsulfat-Fällung

10 ml der angereicherten Enzymlösung werden mit 8,5 ml einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Nach 2 h Stehen zentrifugiert man den ersten Niederschlag und verwirft ihn. Das aktive Protein wird dann mit weiteren 2 ml ges. Amsulf.-Lösung ausgefällt. Man läßt am besten über Nacht stehen, zentrifugiert am folgenden Tage und löst den enzymhaltigen Niederschlag in m/10-Tris/HCl-Puffer, pH 7,2.

3. Darstellung von β - γ - 32 P-ATP

Die enzymatische Umsetzung erfolgt nach Gleichung 35; man benutzt die katalytische Wirkung der aminosäureaktivierenden Enzyme, die wir wie folgt reinigten:

Die Lebern frischgeschlachteter Ratten wurden unter Eiskühlung homogenisiert (21 ml 0,025 m KCl-Lösung für 5 g Leber), Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation, 15 min in einer Phywe-Kühlzentrifuge (15.000 U/min) und anschließende Entfernung der Mikrosomen durch einstündiges Zentrifugieren in der Spinco-Zentrifuge (35.000 U/min). Der Überstand wird mit Ammoniumsulfat auf 0,50-Sättigung gebracht, 15 min stehen

lassen, zentrifugieren, das Protein in m/10-Tris-Puffer, pH 7,2 lösen und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysieren. Am folgenden Tag wird das Dialysat mit Puffer soweit verdünnt, daß es 10-12 mg Protein/ml enthält. Zur Adsorption an Ca-Phosphat-Gel versetzt man das aktive Protein innerhalb von 10-15 min mit soviel Gel, daß auf 3 g Eiweiß 2 g Gel kommen. Man läßt rühren, 20 min stehen und zentrifugiert. Das sedimentierte Gel wird intensiv 3 mal mit m/15 Phosphat-Puffer, pH 7,2 gewaschen und anschließend mit 6%iger Titriplexlösung in einen löslichen Komplex überführt. Die Proteinlösung bringt man auf 0,6-Sättigung an Ammoniumsulfat, zentrifugiert das Protein ab und löst es in Tris-Puffer. Man dialysiert diese Enzymlösung über Nacht gegen m/10-Tris. Sie enthält fast ausschließlich die 3 aminosäureaktivierenden Enzyme, die lysin-, leucin- und valinspezifisch sind.

Der Ansatz enthielt:

0,80 ml	m/5 Tris, pH 7,2
0,20 "	m/10 Mg^{++}
0,20 "	m/10 ATP
0,15 "	trägerfreies ^{32}P -Pyrophosphat
0,10 "	aktivierendes Enzym
0,20 "	m/10 L-Val, L-Leu, L-Lys
0,40 "	H_2O

Den Inkubationsansatz läßt man bei $37^{\circ}C$, 30 min reagieren, stoppt die Umsetzung durch kurzes Erhitzen, zentrifugiert das denaturierte Eiweiß ab und trennt die eingeeengte Lösung auf der Hochspannungselektrophorese (siehe unter "Methoden").

4. Darstellung von γ - ^{32}P -ATP

Obiges Nucleotid synthetisierten wir nach Vorschrift von G. PFLEIDERER (46) unter Benutzung der Enzyme Glycerinphosphataldehyd-dehydrogenase und Phosphoglyceratkinase. An die Trennung der Nucleotide durch Adsorption an Aktivkohle wurde als weiterer Reinigungsschritt noch eine Auftrennung

auf der Hochspannungselektrophorese durchgeführt.

Ansatz: 5,50 ml m/10 Tris/HCl, pH 7,4
 0,70 " trägerfreies ^{32}P -Phosphat
 0,12 " m/40 ADP
 0,20 " m/100 DPN
 0,45 " 3-Phosphoglycerinaldehyd
 0,10 " m/2 Mg^{++}
 0,10 " Oxyd. Ferment
 0,10 " Phosph. übertr. Ferm.

Wir erhielten in 0,8 ml Lösung 240 μCi ^{32}P -markiertes ATP (0,7 μMol), das einer Ausbeute von 20%, bezogen auf das eingesetzte ADP, entsprach.

5. Darstellung von α - ^{32}P -AMP

Die Methode wurde bereits im ersten Teil der Arbeit ausführlich beschrieben, daher folgen jetzt nur die quantitativen Werte.

Ansatz: 0,50 ml ^{32}P -Phosphat, trägerfrei, mit NaOH auf pH 7,0 gebracht
 0,70 " phosphatfreier Lebedew-Saft
 0,10 " m/10 K-Acetat
 0,025 " Adenosin (1%)
 0,10 " m/10 ATP

etwa 15 Stunden inkubieren bei Zimmertemperatur, dann weitere Zugabe von

0,30 ml Lebedew-Saft.
 0,15 " m/10 Mg^{++}

nach 10-stündiger Inkubationsdauer bei Zimmertemperatur wurde der Ansatz durch Hitzedenaturierung enteiweißt und in einer kleinen Probe die Umsetzungsraten bestimmt.

Dies geschah durch elektrophoretische Auftrennung der Nucleotide und Bestimmung ihrer Radioaktivität.

Der Ansatz wurde darauf zur Erhöhung der ^{32}P -Ausbeute und unter Ausnutzung der Hexokinase- und Myokinase-reaktion mit:

6 mg Glucose
0,07 ml Hexokinase
0,7 ml Myokinase

versetzt. Wir ließen den Inkubationsansatz über Nacht bei Zimmertemperatur reagieren, entweißten ihn am folgenden Tage und trennten das Nucleotidgemisch auf einer Dowex-1-Säule. In den mit 0,5 n HCOOH eluierten Fraktionen bestimmten wir spektrophotometrisch den Nucleotidgehalt und im Methandurchflußzähler die Radioaktivität. Die AMP-enthaltenden Fraktionen trennten wir nach dem Einengen durch Gefrier-trocknung elektrophoretisch und bestimmten die spezifische Aktivität unseres Präparates.

Lebedew - Saft

Den bei unseren Umsetzungen verwandten Lebedew-Saft bereiteten wir nach EGGLESTONE (50) aus Bierhefe der Brauerei Henninger, Frankfurt am Main. Die Hefe wurde an der Luft getrocknet und jeweils 100 g trockene Hefe in 300 ml Wasser suspendiert und 4 Tage bei 4°C stehen gelassen. Dieses Autolysat konnte nach Zentrifugation über Monate bei -20°C unter Erhaltung der vollen Enzymaktivität aufbewahrt werden. Vor Gebrauch machten wir jeweils 0,5-1 ml durch Sephadexfiltration bei 0°C phosphatfrei.

6. α - ^{32}P -ATP

Bei dieser Darstellungsmethode bedienten wir uns der Myokinase-reaktion und der Phosphorylierungsreaktion durch Pyruvatkinase. Der Ansatz enthielt:

0,2 ml α -³²P-AMP
20,0 mg PEP-C
20,0 " DPNH
0,01 ml m/100 ATP
0,05 " LDH
0,05 " PK
0,05 " MK
0,05 " m/2 Mg⁺⁺

Die Inkubationsdauer beträgt 20 min bei Zimmertemperatur. Die Umsetzung wird am Photometer "Eppendorf" verfolgt (Abnahme der DPNH-Konzentration bei 366 m μ). Der E₃₆₆-Wert sollte 0,800 sein. Trifft dies nicht zu, dann Zugabe von weiteren 5 mg DPNH. Liegt E₃₆₆ über 0,800 und bleibt konstant, so werden dem Ansatz weitere 5 mg PEP-C und je 0,02 ml der 3 Hilfsenzyme zugefügt.

Die Trennung erfolgt durch Adsorption an Aktivkohle, die wie folgt vorbehandelt wurde: an 200 mg Kohle adsorbiert man 60 mg ATP, rührt 20 min bei Zimmertemperatur und wäscht solange mit einem Gemisch von Wasser, Äthanol und Ammoniak (Vol. Verhältnis : 65:25:10) bis E₃₆₆ kleiner als 0,100 ist. Dann rührt man den Ansatz mit der Hälfte der Kohle (15 min bei Zimmertemperatur), nutscht die Kohle ab und verfährt mit der 2. Hälfte der Kohle ebenso. Die gesammelte Aktivkohle wird mit Wasser solange gewaschen, bis die Radioaktivität nur noch 1/1000 der ursprünglichen beträgt. Danach erfolgt Elution mit obigem Gemisch (H₂O, Äthanol, NH₃) zu je 5 ml. Das Eluat wird durch Gefrier-trocknung eingeeengt und elektrophoretisch aufgetrennt, die ATP-Bande ausgeschnitten und eluiert.

7. Methoden

Phosphatbestimmung: Zur Bestimmung des Gehaltes an anorganischem Phosphat im Lebedew-Saft benutzen wir die Vorschrift (53) nach (55). In der phosphathaltigen Lösung wird Phosphomolybdat durch Reduktion mit Metol in "Molybdänblau" überführt. Die

Reaktion stoppt man durch Zugabe von Na-acetat, das gleichzeitig die entstandene Färbung stabilisiert. Die Extinktion mißt man im Photometer "Eppendorf" bei 578 m μ und 2 cm Schichtdicke.

Proteinbestimmung: Die Eiweißkonzentration bestimmten wir nach der modifizierten Biuretmethode nach WEICHSELBAUM (52). Dazu wurde in einem Zentrifugenglas 1,6 ml dest. Wasser und 0,1 ml der Eiweißlösung (3-6 mg Protein) mit 0,3 ml 40% Trichloressigsäure versetzt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abschütten des Überstandes wurde der Niederschlag mit Biuretreagenz versetzt und 30 min stehen gelassen. Man füllt dann mit 5 ml Wasser auf und bestimmt die Extinktion gegen einen Blindwert im Photometer "Eppendorf" bei 546 m μ und einer Schichtdicke von 2 cm. Die Eiweißmenge bestimmt man nach der Formel:

$$\text{Eiweiß (mg)} = \Delta \varepsilon \times 16,5$$

Elektrophorese:

Für die Trennung von Nucleotidgemischen und Aminosäuren benutzten wir eine Hochspannungselektrophorese der Firma Hormuth (Vetter), Heidelberg, nach Th. WIELAND und G. PFLEIDERER (54). Chromatographiepapier der Firma Schleicher u. Schüll, 2043 a. Eine 11/2-stündige Elektrophoresedauer bei 1500 V, 30-40 mA (Bogenbreite: 15-20 cm) genügte zur vollständigen Trennung der Komponenten.

Für die Trennung der Nucleotide bewährte sich m/10-Citrat/ NH_3 -Puffer, pH 4,2: 21 g Citrat auf 1 Liter Wasser werden mit NH_4OH auf pH 4,2 eingestellt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Aminosäuren erfolgte mit Pyridin-Eisessig-Puffer, pH 6,5: 4450 ml Wasser + 500 ml Pyridin + 50 ml Eisessig. .

Das Pherogramm besprühten wir zur Entwicklung, d.h. Sichtbarmachung der Aminosäuren mit Ninhydrin-Reagens, das wie folgt zusammengesetzt war: 0,5 g Ninhydrin in 300 ml Methanol,

175 ml n-Butanol

15 " 2n Essigsäure

Das besprühte Pherogramm trockneten wir 10 min bei 80°C, wonach die Aminosäuren als blaue bis violette Flecke sichtbar wurden.

Die Adeninnucleotide konnte im UV-Licht gut erkannt und an Hand eines am Pherogrammbogen mitgelaufenen Testgemisches leicht identifiziert werden.

Ionenaustauscher:

Adeninnucleotide trennten wir präparativ an Dowex-1 (Cl^-) X^8 (Siebzahl 100-200 mesh) der Firma Dow-Chem. Corp. Michigan. Der Austauscher wurde in eine Säule von 30 cm Länge und einem Durchmesser von 1 cm gefüllt, mit 4 n HCOOH behandelt und anschließend mit NH_4OH gewaschen und über Nacht stehen gelassen. Das entweißte Adeninnucleotidgemisch wurde dann zur Reinigung des ^{32}P -AMP auf die Säule aufgetragen und jeweils innerhalb von 10 min zu 4,5 ml-Fractionen eluiert. Als Elutionsmittel diente bis Fraktion 23 dest. Wasser, ab Fraktion 24 0,5 n Ameisensäure. Den Nucleotidgehalt der Proben bestimmten wir an einem Zeiß-Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei 260 m μ . Das radioaktivmarkierte AMP war in den Fractionen 39-46 enthalten. Diese wurden durch Gefriertrocknung eingeengt und die Radioaktivität bestimmt. Da das Präparat noch mit 7% ^{32}P -Phosphat verunreinigt war, reinigten wir den Ansatz elektrophoretisch (Citrat/ NH_3 -Puffer, pH 4,2) und eluierten die AMP-Bande. Dieses Präparat war 99,5% rein.

Sephadex-Säulen:

Zur Isolierung von Zwischenprodukten der Glutaminsynthetase aber auch zur Entsalzung des Lebedew-Saftes benutzten wir das Dextrangel Sephadex-G-50 (medium) der Firma Pharmacia, Uppsala. Die Säulenhöhe betrug 15-17 cm, bei 1 cm Durchmesser. Falls nicht im Kühlraum gearbeitet wurde, verwendeten wir von einem Kühlmantel umgebene Säulen. Durch Eiswasser, das durch den Kühlmantel gepumpt wurde, hielten wir die Temperatur der Säulen konstant auf 1°C. Das Dextrangel ließen wir entsprechend der Vorschrift über Nacht quellen, bevor wir es in die mit Wasser vorgefüllten Säulen eingossen. Nach dem gleichmässigen Absetzen des Gels bedeckten wir die obere Randfläche mit einer Filterpapierscheibe, um ein Aufwirbeln der Dextranpartikel beim Beschicken der Säule zu verhindern.

Radioaktivitätsmessung:

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mit einem Methandurchflußzähler (2M) der Firma Friesseke u. Hoepfner, Erlangen. Die Radioaktivität der Pherogramme ermittelten wir, indem wir mit einer Schablone rechteckige Felder aus den zuvor im UV-Licht bezeichneten Stellen ausschnitten und ihre Radioaktivität bestimmten. Daneben wurde natürlich auch der "Papierwert", d.h. die Radioaktivität zwischen den einzelnen Nucleotidbanden gemessen. Die Proben aus den Säulenversuchen trugen wir mit Mikropipetten (0,05 ml bzw. 0,1 ml) auf Aluminiumschälchen auf und trockneten sie mit Hilfe eines Oberflächenverdampfers. Zur Vermeidung eines Randeffektes bestrichen wir die Ränder der Al-Schälchen mit Siliconfett. Bei proteinreichen Fraktionen pipettierten wir die Lösung auf Al-Schälchen, auf die wir zuvor 0,2 ml Wasser aufgetragen hatten. Die proteinhaltige Lösung verteilt sich dadurch über die ganze Fläche des Al-schälchens und erniedrigt so die Selbstabsorption.

8. Darstellung von ^{35}S -p-Chloromercuriphenylsulfonat.

a) Diazotierung von ^{35}S -Sulfanilsäure

Die Umsetzung verläuft nach Gleichung 47.)

Ansatz: 90 mg ^{35}S -Sulfanilsäure (0,52 m Mol)
von Radiochem. Centre, Amersham, (10 mC/mM)
in 0,5 ml H_2O + 0,3 ml 2n NaOH gelöst, dazu
55 mg Natriumnitrit werden langsam, unter
guter Eiskühlung, zu 2 ml 2n HCl gerührt.

Nach Beendigung der Entwicklung von nitrosen Gasen wurde das
auskristallisierte gelbe innere Diazoniumsalz abgenutscht,

2 mal mit 0,2 ml eiskalter 2 n HCl
" " 0,2 " kaltem Äthanol
" " 0,2 " Äther gewaschen.

Ausbeute: 76 mg (=41 mM, 79% d.Th.)

b) Umsetzung mit Quecksilber

Diese verläuft gemäß Gleichung 48 .)

Ansatz: 50 mg p-Diazophenylsulfonsäure (0,27 mMol) gelöst
in 3 ml H_2O , unterschichtet mit 3 ml Quecksilber
in einem dickwandigen Glasrohr. Mit einem Vibro-
mischer wurde in der wässrigen Phase eine Queck-
silbersuspension erzeugt, mit der das Diazonium-
salz 72 Stunden vermischt wurde, zuerst (8Std.)
unter Eiskühlung, dann bei Zimmertemperatur. Die
Umsetzung verfolgten wir durch die Farbreaktion
mit β -Naphthol bei gelegentlicher Probenahme. Sie
war nach 48 Std. praktisch abgeschlossen.

Die trübe, rote, wässrige Lösung wurde filtriert,
mit Ammoniak neutralisiert und gefriergetrocknet.

Der Rückstand wurde mehrmals mit Äthanol gewaschen, wobei ein Großteil der gefärbten Verunreinigungen in Lösung geht. Den zurückbleibenden Kristallbrei nahmen wir in 1 ml heißem Wasser auf, filtrierten, engten durch Gefriertrocknung ein und nahmen die Lösung in 0,5 ml kochendem Wasser auf. Beim Erkalten kristallisiert die Verbindung in Form feiner Kristalle aus, die jedoch noch gelblich gefärbt sind.

Ausbeute: 24 mg (61 μ Mol, 23% d.Th.)

Reinheitsbestimmung: 9,68 mg MPS in Wasser gelöst, schwach gelbe Lösung (nach Einwaage 2,46 μ Mol/ml)

1.) Extinktionsmessungen.

	Wellen- länge μ	Verdün- nung	Extink- tion	Ext.koeffiz. cm^2/mMol	Konzentr. $\mu\text{M/ml}$	% d Einw.
a)	264	1/10	0,153	$\epsilon_{264}=6,2 \cdot 10^2$	2,47	97
b)	243	1/10	0,074	$\epsilon_{243}=2,8 \cdot 10^2$	2,64	104
c)	223	1/100	0,544	$\epsilon_{223}=2,0 \cdot 10^4$	2,72	107

Das Präparat ist also noch mit einer Substanz verunreinigt, die im Kurzwelligen absorbiert.

2.) Cysteinreaktion nach BOYER (46) und G.PFLEIDERER (51)

Meßküvette: 0,1 ml m/10 Cysteinlösung
 2,8 " m/15 Phosphat-Puffer, pH 7,3
 0,1 " MPS-Lösung

Vergleichs-
küvette: 2,9 ml Phosphat-Puffer
 0,1 " MPS-Lösung

Die Bildung der RS-Hg--SO₃H-Verbindung erhöht die Extinktion bei 255 mμ. $\epsilon_{255} = 6 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{mMol}$

Gemessen wurde: $E_{255} = 0,478$, dem entspricht eine Konzentration der MPS-Lösung von

$$c = \frac{0,478 \cdot 3,0}{6,0 \cdot 0,1} = 2,39 \text{ μMol/ml}$$

(= 94% der Einwaage)

3.) Bestimmung durch Inaktivierung und Reaktivierung durch Schweineherz-LDH.

Nach K. WARZECHA (48) entspricht jeder MPS-Konzentration ein bestimmter zeitlicher Verlauf von Aktivierung und Reaktivierung der LDH. Die mit unserer MPS-Lösung (1:15 verdünnt) gefundene Hemmung (maximal nach 11/2 Std. 16%) und Reaktivierung (nach 24 Std. 56% der Ausgangsaktivität) entsprach einer Konzentration von 2,30 μMol/ml (=93% d. Einwaage).

4.) Spezifische Radioaktivität.

Obige MPG-Lösung wurde 1:10 verdünnt und Proben im Methan-durchflußzähler gemessen.

0,02 ml	ergaben	13.223	Imp/ 2 min
0,04 "	"	23.422	"
0,08 "	"	48.344	"

Mittelwert: $6,2 \cdot 10^3 \text{ Imp/2min pro } 1 \cdot 10^{-4} \text{ mg}$
 $= 2,44 \cdot 10^7 \text{ " " μMol}$

Unter gleichen Bedingungen ergab eine Lösung des Ausgangsmaterials ³⁵S-Sulfanilsäure $2,62 \cdot 10^7 \text{ Imp/2 min pro μMol}$. Die spezifische Aktivität betrug demnach 93% der zu erwartenden.

Extinktionsmessung.

Die Konzentrationsbestimmungen unserer synthetisierten ^{32}P -ATP-Präparate erfolgte entweder durch Extinktionsmessung bei 260 mμ ($\epsilon_{260} = 15,0 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$) oder enzymatisch nach (56). Letztere Methode benutzt die Hexokinase- und Zwischenfermentreaktion:



Es wird also die TPNH-Zunahme bei 366 mμ im Photometer gemessen.- Der Testansatz enthielt:

		E_{366}
0,62 ml	m/10 Tris/HCl-Puffer, pH 7,2	
0,02 "	Glucose (0,5 m)	
0,05 "	TPN (2mg/ml)	
0,02 "	Zw.f. (50 %)	
0,05 "	der zu bestimmenden ATP-Lösung	
0,02 "	Mg^{++}	$0,128 \rightarrow E_0$
0,02 "	Hexokinase	$0,173 \rightarrow E_1$
0,80 ml		

E_0 auf Vol. korrigiert: $\frac{(0,128-0,065) \cdot 0,78}{0,80} + 0,065 = 0,126$

Nullwert: 0,76 ml Tris-P

0,02 " HK

0,02 " Mg^{++}

—————→

0,065

$$E = E_1 - E_{0,\text{korr}} = 0,047$$

$$\text{Konz. in d.Küvette: } \frac{0,047}{3,33 \cdot 10^6} = 0,0141 \mu\text{Mol/ml}$$

9.) Optischer Test: (Zur Bestimmung der Synthetaseaktivität)

Der Testansatz enthielt:

2,00 ml	m/10 Tris/HCl-Puffer, pH 7,2
0,08 "	PEP ($1,6 \cdot 10^{-6}$ Mol)
0,10 "	m/2 $MgSO_4$ ($5 \cdot 10^{-5}$ Mol)
0,10 "	2m KCl ($2 \cdot 10^{-4}$ Mol)
0,10 "	m/10 ATP ($1 \cdot 10^{-5}$ Mol)
0,06 "	DPNH ($8 \cdot 10^{-7}$ Mol)
0,02 "	PK
0,02 "	LDH
0,02 "	MK
0,10-0,01 ml	Synthetase
0,25 ml	m/10 L-Glutaminsäure ($2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol)

Herkunft der Testsubstanzen:

Die Hilfsenzyme: LDH, MK, PK sowie PEP-C und DPNH bezogen wir von Firma Boehringer u. Söhne, Mannheim. Das Dinatriumsalz der Adenosintriphosphorsäure von Firma Sigma, Chem. Comp. L-Glutaminsäure und Glutamin von Firma Hoffmann - La Roche, Grenzach.- Tris reinst von Firma Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg.

Die Synthetasereaktion lösten wir erst durch Zugabe der Glutaminsäure aus. Die ohne Substrat gemessene Zeit t_0 für 0,100 Extinktionsabnahme bei 366 mμ im Photometer "Eppendorf", wird als "Blindwert" von Aktivitätswert der Synthetase abgezogen. Die Berechnung der Enzymeinheiten erfolgt nach Formel 52. Ein Zusatz von gesättigter Ammoniumsulfatlösung wirkt sich auf die Enzymaktivität nicht aus:

Normaler Enzymtest-Ansatz	325 EE/ml
"	325 "
+ 0,01 ml ges.Am.s.	320 "
+ 0,02 " "	328 "
+ 0,05 " "	

(siehe Abb.7

Da die Synthetaseaktivität stark temperaturabhängig ist, führten wir alle Tests in einer Temperaturkuvette durch, die von einem Thermostaten auf 25° gehalten wurde.

Die Konstanz des pH-Wertes unseres Testgemisches auf pH 7,2 erreichten wir durch die Pufferwirkung von Tris/HCl und durch Neutralisierung der sauren Testsubstanzen Glu u. ATP mit NaOH. Außerdem überprüften wir laufend die Testansätze mit der Mikroelektrode eines pH-Meters. Die starke pH-Abhängigkeit der Synthetaseaktivität zeigt Abb. 8.

10.) Hydroxamsäure-Test:

Zum Vergleich der Enzymeinheiten des Arbeitskreises von A. M e i s t e r und unserem optischen Test war es nötig, den Hydroxamsäuretest nach (25) durchzuführen. Dazu benötigten wir pro Testansatz:

50	µMole	Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,2
25	"	Mercaptoäthanol
50	"	MgCl ₂ ·6H ₂ O
50	"	L-Glu
100	"	NH ₂ OH-HCl
10	"	ATP
		Enzym

Gesamtvolumen: 1 ml

Die Reagentien werden bei 0°C zusammenpipettiert, die Reaktion am besten durch ATP ausgelöst und bei 37°C 15 min reagieren gelassen. Man unterbricht die Reaktion durch Zugabe der Stopperlösung (1,5 ml je Testansatz).

Die Stopperlösung war 0,37 m an FeCl₃,

0,67 N " HCl

0,20 m " Trichloressigsäure

Eventuell denaturiertes Protein wird abzentrifugiert und die

Extinktion des gebildeten Farbkomplexes gegen einen Blindwert ohne Enzymzusatz bei 535 μ gemessen. Aus den Aktivitätsvergleichen (siehe Abb.9) ergibt sich die Relation:

$$1,1 \text{ Enzymeinheiten (Meister)} = 1 \text{ Enzymeinheit (wir).}$$

11.) Zündreaktion:

Bestimmung der bei der Zündreaktion freigesetzten ADP-Menge durch einen gekoppelten optischen Test, bei dem die Extinktionsabnahme, bedingt durch den Verbrauch von DPNH, bei 366 μ gemessen wird (siehe Abb. 10).

Die "Testlösung" enthielt:

0,66 ml m/10-Tris/HCl-Puffer pH 7,2
0,08 " PEP
0,06 " DPNH
0,10 " m/2 MgSO_4
0,10 " 2m KCl

Testansatz:

1,00 ml Testlösung
0,02 " LDH
0,02 " PK
0,04 " m/10 ATP
0,02 " MK
0,20 " Enzym (= 370 EE)
1,30 ml

Versuch Nr. 3, Tab. 7

E_{366}	t	
0,748	0	
0,705	30"	
		13
0,692	1'	26
0,666	2'	16
0,650	3'	14
0,636	4'	10
0,626	5'	16
0,611	7'	7
0,604	8'	5
0,599	9'	5
0,594	10'	5
0,589	11'	
0,545	22'	
0,541	23' }	$\frac{55}{13} = 4,2$
0,486	36')	

Der E-Wert für t_0 wurde extrapoliert aus dem E-Wert nach MK-Zugabe unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Eigenextinktion des Enzymproteins (die extra bestimmt wurde). Der "Gang" beträgt 0,004 für 1 min, er wird wie folgt berücksichtigt:

$$\frac{(\text{E - Gang}) \times \text{Küvettenvolumen (ml)}}{3,33 \cdot 10^6} = \text{Mole ADP}$$

d.h. für Versuch Nr. 3:

$$\frac{0,114 \cdot 1,3}{3,33} = 0,0447 \mu\text{M für 370 EE}$$

$$\text{oder } \underline{\underline{83 \text{ EE für } 0,01 \mu\text{M ADP}}}$$

Nebenrechnung:

$$\begin{array}{rcl} 0,748 & = & E_{366} \text{ für } t_0 \\ - 0,594 & " & " \quad " \quad t_{10} \\ \hline 0,154 & = & \Delta E \\ - 0,040 & = & E_{366} \text{ für 10 min -Gang (10 x 0,004)} \\ \hline 0,114 & & \end{array}$$

Versuch 4:

1,00 ml	Testlösung	E_{366}	ΔE
0,02 "	LDH		
0,02 "	MK	0,751	0
0,20 "	Enzym (= 370EE)	0,668	1'
0,04 "	m/10 ATP	0,596	9'
<u>0,02 "</u>	<u>PK</u>	<u>0,592</u>	<u>10'</u>
1,30 ml	Testansatz	0,576	14' } $\frac{16}{4} = 4$

$$\begin{array}{rcl} \frac{0,119 \cdot 1,3}{3,33} = 0,047 \mu\text{M ADP} & 0,751 & = E_{366} \text{ für } t_0 \\ & - 0,592 & = "_{366} \text{ für } t_{10} \\ & 0,159 & = \Delta E \\ \text{oder: } \underline{\underline{79 \text{ EE für } 0,01 \mu\text{M ADP}}} & - 0,040 & = E_{366} \text{ für 10-Min Gang} \\ & 0,119 & \end{array}$$

Die Daten einiger der in Tab. 7 aufgeführten Versuche werden wie folgt verkürzt angegeben:

Versuch Nr. 1:

Testansatz:	1,30 ml	
Enzym :	0,20 "	(= 370 EE)
$E_{366}=E =$	0,644	
$+ \Delta E_{\text{Enzym}}$	0,095	(da mit Enzym die Reaktion ausgelöst)
	<u>0,739</u>	

E für t_8 : - 0,522

0,217

E f. 8-Min Gang 0,064

ΔE : 0,153

$$\frac{0,153 \cdot 1,3}{3,33} = 0,0595 \mu\text{M ADP}$$

d.h. 63 EE für 0,01 $\mu\text{M ADP}$
=====

Versuch No. 2:

Testansatz:	1,30 ml	
Enzym :	0,20 "	(= 460 EE)
E	= 0,744	
$- E_{\text{ATP}}$	= 0,087	(mit ATP ausgelöst)
	<u>0,657</u>	

E für t_8 = 0,472

0,185

E für 8-Min = 0,056

ΔE : 0,129

$$\frac{0,129 \cdot 1,3}{3,33} = 0,0508 \mu\text{M ADP}$$

d.h. 91 EE für 0,01 $\mu\text{M ADP}$
=====

Versuch No. 6

Testansatz: 1,32 ml
Enzym : 0,20 " (= 215 EE)

$$E = 0,632$$

$$+ E_{\text{Enzym}} = 0,091$$

$$0,723$$

$$E \text{ für } t_6 - 0,637$$

$$0,086$$

$$E \text{ f. 6 min-}$$

$$\text{Gang } 0,030$$

$$\Delta E \quad 0,056$$

$$\frac{0,056 \cdot 1,32}{3,33} = 0,021 \mu\text{M ADP}$$

d.h. 100 EE für 0,01 $\mu\text{M ADP}$

=====

Versuch No. 8

Testansatz: 1,19 ml
Enzym : 0,10 ml (= 157 EE)

$$E = 0,851$$

$$+ E_{\text{Enzym}} = 0,030$$

$$0,881$$

$$E \text{ für } 1_{10} - 0,760$$

$$0,121$$

$$-E \text{ für 10min-}$$

$$\text{Gang } 0,070$$

$$\Delta E \quad 0,051$$

$$\frac{0,051 \cdot 1,19}{3,33} = 0,018 \mu\text{M ADP}$$

d.h. 87 EE für 0,01 $\mu\text{M ADP}$

=====

12.) Hemmbarkeit der Enzymaktivität durch Phosphat.

Jeweils 0,05 ml eines Enzympräparates zeigten bei Zusatz steigender Konzentrationen von Phosphat-Puffer folgende Synthetaseaktivität:

a)	Normal-Testansatz mit	m/10-Tris-Puffer, pH 7,2	466 EE/ml
b)	"	" m/10-Phosphat-P.	" 350 "
c)	"	" m/6 "	" 280 "
d)	"	" m/3 "	" 130 "
e)	"	" m/2 "	" 111 "
f)	"	" 1m "	" 73 "

Die Ansätze unterscheiden sich also nur durch den Puffer, die übrigen Testreagentien wie unter 9 (optischer Test) beschrieben.

13.) Aktivierungsreaktion

Das bei der Aktivierungsreaktion $E-ATP + Glu \rightarrow E-P-Glu + ADP$ freiwerdende ADP konnte ebenfalls enzymatisch-optisch bestimmt werden.

Der Testansatz enthielt:

0,90 ml	Testlösung, pH 5,5
0,05 "	Enzym (=58 EE)
0,005 "	LDH
0,005 "	PK
0,01 "	ATP
0,02 "	L-Glu
0,99 ml	

$$\begin{aligned}
 \text{a) } E_{366} &= 0,847 \\
 E \text{ für } t_4 &= - \underline{0,770} \\
 &0,077 \\
 E \text{ für 4 Min-} & \\
 \text{Gang} &= - \underline{0,052} \\
 \Delta E &= 0,025
 \end{aligned}$$

$$\frac{0,025 \cdot 0,99}{3,33} = 7,3 \cdot 10^3 \mu\text{M ADP}$$

d.h. 80 EE für 0,01 $\mu\text{M ADP}$
=====

$$\begin{aligned}
 \frac{0,016 \cdot 0,99}{3,33} &= 4,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{MADP} \quad \text{b) } E = 0,763 \\
 E \text{ für } t_6 &= - \underline{0,681} \\
 &0,082
 \end{aligned}$$

d.h. 120 EE für 0,01 $\mu\text{M ADP}$
=====

$$\begin{aligned}
 E \text{ f. 6 min-} & \\
 \text{Gang} &= - \underline{0,066} \\
 \Delta E &= 0,016
 \end{aligned}$$

14.) Mg⁺⁺-Abhängigkeit

Jeder Testansatz enthielt:

0,25 ml Medium:	50 μ Mol	Imidazol-Puffer, pH 7,2	} pro ml.
	25 "	Thioglycol	
	100 "	NH ₂ Cl	

und 5 EE a) Schafhirn-Glutaminsynthetase
 b) Erbsen-Enzym

dazu: Test No 1	:	+	0,03 ml	H ₂ O
2	:	+	0,03 "	m/2 MgCl ₂
3	:	+	0,03 "	m/10 NaF
4	:	+	0,03 "	m/10 EDTA
5	:	+	0,03 "	m/2 MgCl ₂
6	:	+	0,03 "	m/2 "

Diese 6 Teste wurden 20 min bei Zimmertemperatur vorinkubiert,
 darauf No 1-4 mit je 0,025 ml DL -¹⁴C - Glu
 und " 5 " " 0,025 ml m/10 D-Glu
 6 " " 0,025 ml m/10 L-Glu versetzt.

Die Reaktion wurde bei allen Testen (1-6) durch Zugabe von
 0,05 ml m/10 ATP ausgelöst.

Inkubationsdauer: 20 min, dann Hitzedenaturierung und elektro-
 phoretische Auftrennung bei pH 6,5 (Pyridin/Eisessig).

Die Radioaktivität der Glu und GluNH₂-banden wurde bestimmt:

Test: 1	a) GluNH ₂	418 Imp/1,	b)	273 Imp/1,
	Glu	15.576 "		24.300 "
2	GluNH ₂	9.455 "		4.577 "
	Glu	16.676 "		17.610 "
3	GluNH ₂	659 "		304 "
	Glu	27.405 "		26.300 "
4	GluNH ₂	303 "		291 "
	Glu	34.105 "		25.200 "
5	GluNH ₂	++		+
	Glu	+		+
6	GluNH ₂	+		+
	Glu	+		+

Die Mg^{++} -Abhängigkeit der Glutaminbildung wird in Test No 2 deutlich erkennbar. Bei den nicht $-^{14}C$ -haltigen Ansätzen wurden die Aminosäuren durch Besprühen mit Ninhydrin sichtbar gemacht.

15.) ADP*/ATP-Austausch

Die Testansätze enthielten:

- | | | | |
|----|--|----|----------------------------|
| a) | 0,02 ml Enzym (= 25 EE) | b) | wie a) |
| | 0,50 " K-Acetat-Puffer, pH 6,0 | | + 0,02 ml m/15 PO_4^{3-} |
| | 0,01 " m/2 Mg^{++} | | |
| | 0,02 " m/100 ADP* | | |
| | 0,02 " m/100 ATP | | |
| c) | wie b | d) | 0,02 ml Enzym |
| | + 0,02 ml m/10 L-Glu | | 0,50 " K-Ac-Pu. |
| | | | 0,01 " m/2 Mg^{++} |
| | | | 0,02 " m/100 ADP |
| | | | 0,02 " m/100 ATP |
| | | | 0,02 " PO_4^{3-*} |
| | | | 0,02 " m/10 L-Glu |
| e) | wie d, jedoch ohne L-Glu | | |
| f) | wie d, jedoch + 0,02 ml m/10 $GluNH_2$ | | |

Die Ansätze inkubierten wir 20 min bei Zimmertemperatur, entleierten durch kurzes Erhitzen im Wasserbad und trennten das Gemisch elektrophoretisch bei pH 4,2 (Citrat/ NH_3).

Die ADP und ATP-Banden wurden ausgeschnitten und die Radioaktivität bestimmt.

	ADP	ATP	$\frac{ATP}{ADP}$
a	4.482 Imp/1,	8.790 Imp/1,	1,96
b	2.986 "	4.926 "	1,65
c	3.158 "	8.122 "	2,6
d	153 "	138 "	0,96
e	64 "	96 "	1,50
f	102 "	95 "	0,93

III. Die Ansätze enthielten:

0,25	ml	Puffer
0,025	"	Enzym
0,02	"	m/100 ADP
0,02	"	m/100 Po_4^{3-} *

sowie für Ansatz:	1	10 μM	AMP	u.	10 μM	D-Glu
	2	1	"		1	"
	3	0,1	"		0,1	"
	4	0,01	"		0,01	"
	5	0			0	

Auswertung:		Zahlenwerte = Imp/10 min			
Ansatz No	AMP	ADP	ATP	Po_4^{3-}	$\frac{\text{ADP}}{\text{ATP}}$
1	19	47	58	4.500	0,8
2	23	145	0	5.000	145
3	0	200	47	5.100	4,3
4	25	100	60	5.000	1,7
5	5	140	146	5.300	1

IV. Ansätze wie III, jedoch ohne Glutaminsäure und Zusatz von 0,03 ml m/10-EDTA

Auswertung:		Zahlenwerte = Imp/10 min			
Ansatz No	AMP	ADP	ATP	Po_4^{3-}	$\frac{\text{ADP}}{\text{ATP}}$
1	0	95	16	5.000	6
2	6	180	0	5.200	180
3	10	500	0	5.000	500
4	21	750	11	5.000	70
5	0	540	27	5.000	21

16.) ^{32}P /ATP-Austausch

I. Die Ansätze von 1-5 enthielten:

0,25 ml Puffer (Imidazol + Thioglycol)
 0,025 " Enzym (50 EE)
 0,02 " m/100 ATP
 0,02 " m/100 PO_4^{3-} *

dazu Ansatz 1 : 10 μMol ADP
 2 : 1 " "
 3 : 0,1 " "
 4 : 0,01 " "
 5 : 0 " "

Inkubationsdauer: 30 min bei Zimmertemperatur.
 Nach dem Enteiweißen, Auftrennung durch Elektrophorese

Auswertung:

Zahlenwerte = Imp/10min

Ansatz No	AMP	ADP	ATP	PO_4^{3-}	$\frac{\text{ADP}}{\text{ATP}}$
1	0	105	65	12.000	1,6
2	12	80	90	12.000	0,9
3	0	66	48	12.000	1,4
4	3	19	25	12.000	0,8
5	0	16	72	12.000	0,2

II. Die Ansätze wie bei I, jedoch zusätzlich steigende Konzentrationen von D-Glutaminsäure in der gleichen Konzentration wie ADP. Ohne Nullwert (Ansatz 5)

Auswertung:

Zahlenwerte = Imp/10 min.

Ansatz No	AMP	ADP	ATP	PO_4^{3-}	$\frac{\text{ADP}}{\text{ATP}}$
1	0	84	58	11.000	1,5
2	25	29	14	10.000	2,0
3	10	90	8	10.000	11
4	0	35	41	11.000	0,8

17.) Versuche mit p-³⁵S-Mercuriphenylsulfonat

Ansatz: 0,25 ml Enzym (= 530 EE)

0,25 " MPS = 0,57 μ M

0,50 ml

1/2 Std. bei 0°C inkubiert, danach Aktiv.Test, nur noch 4% Restaktivität,

davon : 0,33 ml auf Sephadex-G50-Säule,

bei 0°C mit m/10-Tris, pH 6,8 eluiert.

Frakt.	Tropfen	ml	cpm/ 0,05 ml	0,02/1,12 ml t ₂	EE/ml	korr. EE 0,25 ml
7	10	1,75	12.850	110"	51	14,7
8	10	2,0	77.000	18"	311	89,4
9	10	2,25	69.000	16"	350	100,5
10	10	2,50	42.300	25"	224	64,3
11	10	2,75	23.500	65"	86	24,7
12	10	3,0	11.000	140"	40	11,5
13	10	3,25	7.000			305 EE
14	10	3,50	5.300			von 360 EE
15	10	3,75	3.745			aufgetragen.
16	10	4,0	3.100			
17	10	4,25	3.000			

0,57 μ M MPS - ³⁵S in 0,25 ml = 0,63 . 10⁷ cpm

Fraktion 9: = 69.000 cpm/0,05 ml = 100 EE/0,25 ml (korrigiert)

$$\frac{3,45 \cdot 10^5 \cdot 0,57}{6,3 \cdot 10^6} = 0,0312 \mu\text{M für 100 EE}$$

d.h. für 0,01 μ Mol = 32 EE
=====

Fraktion 11:= 25 EE/0,25 ml : 117.500 cpm/0,25 ml

$$\frac{1,175 \cdot 10^5 \cdot 0,57}{6,3 \cdot 10^6} = \frac{0,67}{63} =$$

d.h. für 0,01 μ Mol = 25 EE
=====

In einem weiteren Versuch inkubierten wir:

0,30 ml Schafhirnenzym (= 255 EE)
 +0,05 " ^{35}S - MPS (30 min. Zimmertemperatur)

Nach dieser Inkubationszeit zeigte das Enzym noch 43% Aktivität. Es wurde auf einer Sephadex - G - 50 (medium)-Säule vom überschüssigen Hg-Reagens abgetrennt.

Nach einem Vorlauf von 1,5 ml, fraktionierten wir jeweils 0,35 ml und prüften auf Enzymaktivität und ^{35}S -Radioaktivität.

Fraktion	EE/ml	Imp/ml
6	0	1800/5'
7	0	3100/5'
8	1,1	5250/5'
9	2,9	3340/1'
10	3,9	5820/1'
11	3,3	3990/1'
12	3,1	2640/1'
13	1,6	1045/5'

Die Fraktionen 9-12 : 13,2 EE/ml mit 14.590 Imp/1'/ml (ohne Blindwert) an ^{35}S -MPS.

Da $7 \cdot 10^6$ Imp/1, $\approx$ 2,3 μMol ^{35}S -MPS waren, entsprechen 0,01 μMol MPS : 27 EE der Synthetase.

18.) Versuche mit ATP (Tab. 12)

Versuch No 1:

Ansatz: 0,2 ml Enzym (=180 EE; 13,4 μ Mol P_{an})
 0,1 " γ^* -ATP (1 μ Mol; 2.500 Imp/₂, $\approx 1 \cdot 10^{-4}$ μ Mol)
 0,02 " Mg Cl_2
 0,32 ml

Davon 0,25 ml (= 180 EE) auf Sephadex - G - 50 (med)-
 Säule 16x 1,1 cm, Äquibriert mit m/10-Tris-Puffer,
 pH 6,5, Temp. 1°C., 1,5 ml Vorlauf, dann Fraktionen von
 15 Tropfen = 0,4 ml.

Fraktions- No.	ml	t_2 / 0,1 ml	EE/ ml	Imp/ 10 min/ 0,1 ml	μ /Mol/ ml	EE/ 0,01 μ Mol
3	2,3-2,7	830"	1,3	350	$0,28 \cdot 10^{-4}$	464
4	3,1-3,5	990"	1,1	1630	1,30. "	84
5	3,5-3,9	115"	9,6	830	0,66. "	1460
6	3,9-4,3	11"	100	3520	2,82. "	3550
7	4,3-4,7	7"	146	4950	3,96. "	3690
8	4,7-5,1	10"	105	4670	3,73. "	2820
9	5,1-5,5	15"	73	3460	2,77	2630
10	5,5-5,9	23"	48	2260	1,81	2650
11	5,9-6,3	50"	22	1960	1,57	1400
12	6,3-6,7	110"	10	1430	1,14	880
13	6,7-7,1	150"	7,3	1230	0,98	740
14	7,1-7,4	200"	5,5	1450	1,16	475
15	<u>7,4-7,8</u>	300"	3,7	1220	0,97	381

Frakt.Vol. 6,3 ml

Die in Tab. 12 in der letzten Spalte stehenden Werte er-
 geben sich aus den vorliegenden Äquivalenzwerten nach
 Division durch 14,4; d.h. unter Berücksichtigung des Phos-
 phatgehaltes des Testansatzes von $13,4 + 1 = 14,4$ μ Mol.
 Als Mittelwert der Fraktionen 5-12 ergibt sich:

$$\Sigma = 1325 : 8 = \bar{m} = 165 \text{ EE}/0,01 \mu\text{Mol Wirkstellenäquivalent.}$$

Versuch No. 2

Ansatz: 0,4 ml Enzym (26,7 $\mu\text{Mol P}$)
 0,12 " γ -ATP* (0,223 μMol ; $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mol} =$
 0,05 " K-Az. pH 5,5 120 Imp/min
 2,0 mg NaF
 40 mg Rinderserumalbumin

Enzymreichste Fraktionen:	EE/ ml	μMole P*/ml	EE/0,01 μMol
G 5	331	ca. $2,85 \cdot 10^{-2}$	116
G 6	137	" $1,14 \cdot 10^{-2}$	120
G 7	51	" $0,9 \cdot 10^{-2}$	57

Versuch No. 3

Ansatz: 0,2 ml Enzym (13,4 $\mu\text{Mol P}$)
 0,1 " γ -ATP (2,6 $\cdot 10^{-1} \mu\text{Mol}$; $1,10^{-5} \mu\text{Mol}$
 0,02 " Mg Cl₂ 3600 Imp/min

7	110	$2,76 \cdot 10^{-5}$	685
8	55	$2,61 \cdot 10^{-5}$	354
9	26	$1,28 \cdot 10^{-5}$	278
10	9	$0,47 \cdot 10^{-5}$	135

Versuch No. 4

Ansatz: Fraktion 6.7,8 aus Versuch 3 $\rightarrow$ 68 EE/Ml
 0,1 ml = 1675 Imp/2, = $1,22 \cdot 10^{-3} \mu\text{Mol P}^*$

6	0,4	$2,4 \cdot 10^{-5}$	166
7	0,5	$2,7 \cdot 10^{-5}$	185
8	4,8	$9,6 \cdot 10^{-5}$	500
9	3,1	$8,3 \cdot 10^{-5}$	267

Versuch No 5

Ansatz: 0,2 ml P-Enzym (13,4 $\mu\text{Mol P}$)
 0,2 " γ^* -ATP (0,22 μMol ; $1 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{Mol} \approx 1360$
 0,02 " Mg Cl_2 Imp/2"

Fraktion	EE/ml	$\mu\text{Mol P}^*/\text{ml}$	EE/0,01 μMol
6	25	$3,8 \cdot 10^{-4}$	48
7	116	$6,35 \cdot 10^{-4}$	134
8	88	$4,91 \cdot 10^{-4}$	132
9	26	$3,11 \cdot 10^{-4}$	61

Versuch No 6

Ansatz: 0,4 ml Enzym (= 760 EE)
 0,2 " $\beta^* - \gamma^*$ -ATP
 0,05 " NaF
 50 mg Rinderserumalbumin

I	176	-	430
II	59	$5 \cdot 10^{-4}$ μMMP^*	88

Versuch No 7

Ansatz: 1 ml Enzym (= 1160 EE)
 0,2 " $\beta - \gamma^*$ -ATP (0,01 μMol = 1400 Imp/min)
 0,1 " m/10-NaF

I	113	$3,6 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{Mol ATP}^*$	410
II	16	$3,3 \cdot 10^{-3}$ " "	50

Versuch No 8

Ansatz 0,2 ml Enzym (= 172 EE)
 0,2 " Tris-Puffer
 0,1 " MPS

30 Min inkubiert, bei 0°C.

dann: + 0,05 ml α^* -ATP (0,15 $\mu\text{Mol} \approx 2,25 \cdot 10^7$ Imp/min)

3	3,0	$0,3 \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{Mol ATP/ml}$	84
4	6,2	$0,3 \cdot 10^{-5}$	" "	190
5	17,5	$1,3 \cdot 10^{-5}$	" "	130
6	60,0	$3,8 \cdot 10^{-5}$	" "	156
7	35,0	$3,3 \cdot 10^{-5}$	" "	106
8	16,5	$3,1 \cdot 10^{-5}$	" "	51

Versuch No 9

Ansatz: 0,2 ml Enzym (13,4 $\mu\text{Mol P}$)

0,1 " Tris-Puffer

0,1 " MPS

30' $\longrightarrow$ inaktiv

+ 0,1 ml m/10 Cys., pH 7,2 $\longrightarrow$ reaktiviert

+ 0,05 " α -ATP* (0,15 μMol ; $1 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{Mol} \approx 600 \text{ Imp/}_1$.)

Fraktion	EE/ml	$\mu\text{Mol ATP/ml}$	EE/001 μMol
4	6	$7 \cdot 10^{-4}$	87
5	64,7	$47 \cdot 10^{-4}$	138
6	52,3	$32 \cdot 10^{-4}$	163
7	25,6	$12,7 \cdot 10^{-4}$	201
8	9	12,1	76

19.) Versuche mit 32PO_4^{3-} (Tabelle 13)

Versuch No 1

Ansatz: 0,2 ml Erbsen-Enzym (13,35 $\mu\text{Mol P}$)

0,05 " $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ (2,5 $\mu\text{Mol P}^*$; 10^{-4} $\mu\text{Mol} \approx 2000$

0,05 " ATP (2,5 μMol) Imp/2,

Versuch No 2

Ansatz: 0,05 ml Erbsen-Enzym
7 $\mu\text{Mol P}^*$ (ca 3600 Imp/1, $\approx 1,10^{-3}$

0,2 ml ATP μMol

Versuch No 3

Ansatz: 0,2 ml Schafhirnenzym (=250' EE)
 0,05 " m/20 P* (2,5 μ Mol, 1000 Imp/1,
 $\approx 1 \cdot 10^{-4}$ μ Mol)
 0,025" m/10 ATP (2,5 μ Mol)
 0,02 " m/10 Mg Cl₂

20.) Versuche mit ^{14}C -Glutamat

- a) Ansatz: 0,30 ml Enzym (= 250 EE)
 0,02 " m/100 ATP
 1,43 mg NaF
 0,02 ml ^{14}C - L - Glu ($1 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{Mol} \approx 200$ Imp/min)

10 min inkubiert bei Zimmertemperatur, dann durch Sephadex-G 50-Säule filtriert (0°C) - eluiert mit m/10-Na-Citrat, pH 5,5.

Fraktion	EE/ml	t/1000 Imp/0,1 ml	Imp/ 1'/ml	μM Glu/ ml	EE/ 0,01 μMol
7	4	2,69	3.720	$18,60 \cdot 10^{-4}$	22
8	9,5	12,07	830	4,15. "	230
9	5,5	16,52	605	3,02. "	183
10	3,5	35,30	283	1,41 "	248
11	1,8	39,01	256	1,28 "	140
12	1,5	42,80	233	1,16 "	130

- b) Ansatz: 0,30 ml Enzym (= 345 EE)
 0,02 " m/100 ATP
 1,4 mg NaF
 0,02 ml ^{14}C -L-Glu ($1 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{Mol} \approx 200$ Imp/min)

Versuchsbedingungen wie oben; eluiert mit m/50 - NH_3 /Formiat-Puffer, pH 5,5. Es wurden 50% der Enzymeinheiten wiedergefunden.

Fraktion	EE/ml	t/400 Imp/ 0,05 ml	Imp/1' ml	μM Glu/ ml	EE/ 0,01 μMol
13	50	12,82	620	3,1	1.600
14	120	10,60	750	3,75	3.200
15	115	9,21	870	4,35	2.600
16	58	10,77	740	3,70	1.600
17	25	11,96	670	3,35	750
18	12	13,34	600	3,00	400

21.) Blindwerte

0,4 ml einer $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ - Lösung (0,05 ml = 7.000 Imp/1')
wurden auf eine Sephadex - G 50 -Säule aufgetragen.
Eluiert mit dest. Wasser, Tropfgeschwindigkeit: 7-8 Tr/min.

Fraktion	Imp/1'/0,1 ml	Fraktion	Imp/1'/0,1 ml
1	508	13	186
2	437	14	140
3	245	15	114
4	155	16	153
5	328	17	101
6	1121	18	142
7	728	19	102
8	303	20	97
9	203	21	144
10	250	22	120
11	152	25	600
12	169	28	> 2000

Literaturverzeichnis

- (1) E. SCHULZE u. E. BOSSHARD Landwirtsch. Vers.Sta.
29/295 (1883)
- (2) H. HLASIWETZ u. J. HABERMANN Ann. 169/150 (1873)
- (3) P. R. SRINIVASAN J. Am. Chem. Soc.
81/1772 (1959)
- (4) B. WEISS u. P. R. SRINIVASAN Proc. Natl. Acad. Sc.
45/1491 (1959)
- (5) L. LEVINTOW Science 126/611 (1957)
- (6) J. PREISS u. P. HANDLER J. biol. Chem. 225/759 (1957)
" 233/111 (1958)
J. Am. Chem. Soc. 79/1514 (1957)
- (7) van SLYKE u. Mitarb. J. biol. Chem.
150/481 (1943)
- (8) A. MEISTER u. S. V. TICE J. biol. Chem.
187/173 (1950)
- (9) M. B. HOAGLAND Biochem. Biophys. Acta
16/228 (1955)
- (10) M. B. HOAGLAND,
P. C. ZAMECNIK,
T. LIPMANN Biochem. Biophys. Acta
26/215 (1957)
- (11) K. BLOCH u. Mitarb. J. Biol. Chem.
179/1245 (1949)
199/407 (1952)
- (12) I. E. SNOKE, K. BLOCH J. biol. Chem.
199/407 (1952)
- (13) J. E. SNOKE,
S. YANARI,
K. BLOCH J. biol. Chem.
201/573 (1953)
- (14) J. E. SNOKE J. biol. Chem.
213/813 (1955)

- (15) A.H. KREBS Biochem. Jour.
29/1951 (1935)
- (16) M. BERGMANN Ber. 66/1288 (1935)
- (17) E. BUJARD u.
F. LEUTHARDT Helv. Physiol. et Pharmacol
Acta 5/C 39 (1947)
- (18) F. Leuthardt u.
E. BUJARD Helv. Med. Acta
14/274 (1947)
- (19) J.F. SPECK J. biol. Chem.
168/403 (1947)
- (20) W.H. ELLIOTT Nature 161/128 (1948)
- (21) J.F. SPECK J. biol. Chem.
179/1387, 1405 (1949)
- (22) W.H. ELLIOTT Biochem. J.
49/106 (1951)
- (23) W.H. ELLIOTT u.
E.F. GALE Nature 161/129 (1948)
- (24) F. LIPMANN u.
L.-C. TUTTLE J. biol. Chem.
159/21 (1945)
- (25) V. PAMILJANS,
P.R. KRISHNASWAMY,
G.D. DUMVILLE u.
A. MEISTER Biochemistry
1/153 (1962)
- (26) W.H. ELLIOTT J. biol. Chem.
201/661 (1953)
- (27) L. LEVINTOW u.
A. MEISTER Fed. Proc. 15/299 (1956)
- (28) P.D. BOYER,
O.J. KOEPPE u.
W.W. LUCHSINGER J. Am. Chem. Soc.
78/356 (1956)

- (29) A. KOWALSKY et al. J. biol. Chem.
219/719 (1956)
- (30) V.E. VARNER u. Plant Physiol.
G.C. WEBSTER 30/393 (1955)
- (31) P.K. KRISHNASWAMY, J. biol. Chem.
V. PAMILJANS u. 237/2932 (1962)
A. MEISTER
- (32) P.D. BOYER, Arch. Biochem. Biophys.
R.C. MILLS u. 81/249 (1959)
H.J. FROMM
- (33) J.F. SPECK J. biol. Chem.
179/1405 (1949)
- (34) Enzymes Band 6/466
- (35) M. STAEHELIN, Helv. Chim. Acta
F. LEUTHARDT 38/184 (1955)
- (36) L. LEWINTOW J. Am. Chem. Soc.
A. MEISTER et al. 77/5304 (1955)
- (37) P.K. KRISHNASWAMY, J. biol. Chem.
V. PAMILJANS u. 235/ PC 39 (1960)
A. MEISTER
- (38) S.C. HARTMANN u. J. biol. Chem.
J.M. BUCHANAN 233/ 456 (1958)
- (39) J.M. BUCHANAN u. Advances in Enzymology
S.C. HARTMAN 21/199 (1959)
- (40) TH. WIELAND, Bio. Z.
G. PFLEIDERER, 330/ 198 (1958)
B. SANDMANN
- (41) B. SANDMANN Dissertation, Frankfurt/Main
(1958)

- (42) A. DAHLINGER Dissertation Frankfurt/M.
(1962)
- (43) A. MEISTER The enzymes,
Vol. 6/443 (1962)
- (44) D. KEILIN,
E.F. HARTEE Proc. roy. Soc.
121/173 (1936)
- (45) H. RAUCHFUSS Diplomarbeit Frankfurt/M.
(1961)
- (46) P.D. BOYER Am. Chem. Soc. 76/4334 (1954)
- (47) W. GRUBER unveröffentlicht
- (48) K. WARZECHA Diplomarbeit Frankfurt/M.
(1961)
- (49) G. BEISENHERZ,
H.J. BOLTZE,
TH. BÜCHER,
R. CZAK,
K.H. GARBADE
E. MEYER - ARNEND u.
G. PFLEIDERER Z.f. Naturforschung
Bd. 86, Heft 10, 555 (1953)
- (50) L.V. EGGLESTONE Biochem. Jor.
58/504 (1954)
- (51) G. PFLEIDERER,
D. JECKEL,
TH. WIELAND Arch. of Biochem. and Biophys.
83/275 (1959)
- (52) T.E. WEICHELBAUM Am.J. Clin. Path. Techn. Sec.
10/40 (1946)
- (53) Anleitungen zum Photometer
"Eppendorf"

(54) TH. WIELAND,
G. PFLEIDERER

Angew. Chemie
67/257 (1955)
69/199 (1957)
70/341 (1958)

(55) C.H. FISKE,
Y. SUBBAROW

J. Biol. Chem. 66/375 (1925)

(56) W. LAMPRECHT

Z. f. Phys. Chem.
311/245 (1958)

Ich versichere an Eides statt, daß ich zur
Anfertigung der vorliegenden Dissertation
keine unerlaubten Hilfsmittel und nur die
im Verzeichnis angegebene Literatur benutzt
habe.

Frankfurt am Main, 1. Juni 1964

H. Reimpp

Name: Horst Rauchfuß

geboren: 11. Juni 1927 in Eisleben

Schulbildung: 5 Jahre Volksschule in Tetschen-
Bodenbach/Elbe

6 Jahre Oberschule in Tetschen-
Bodenbach/Elbe

2 1/2 Jahre Abiturskurs in Frankfurt
am Main Goethe-Gymnasium

RAD., Wehrdienst und Kriegsgefangenschaft von 1944-1948

1951 Abitur

Studium: 1952 Beginn des Chemie-Studiums an
der Johann Wolfg. Goethe-Univer-
sität, Frankfurt am Main

1954 einjährige Unterbrechung des
Studiums

1956 Diplom-Chemiker Vorexamen

1959 Diplom-Chemiker Hauptexamen

Diplomarbeit Thema:
Zur enzymatischen Aminosäure-
aktivierung

1961 / 1964 Dissertation: Zum Wirkungsmecha-
nismus der Glutamin synthetase

